

## 明 細 書

不稔性植物体の生産方法およびこれを用いて得られる植物体、並びにその利用

### 技術分野

[0001] 本発明は、不稔性植物体を生産する技術に関し、より詳細には、植物の雄性不稔体の生産方法、葯の裂開が抑制された植物体の生産方法、八重咲き植物体の生産方法、およびこれらの生産方法を用いて得られる植物体、並びにその利用に関するものである。

### 背景技術

[0002] 異なる品種間で交配させ、雑種を作ると、両親より優れた形質が子供に現れる。これを雑種強勢という。この雑種強勢を利用した交配により、農産物をハイブリッド化して優良品種を作出することが、現在、一般的になっている。例えば、主要な野菜や穀物の優良品種のほとんどは、こうした交配により品種改良されている。

[0003] 雑種強勢の利益を受けるためには、互いに異なった品種間で交配させる必要がある。このため、交配を行う品種において、自家受粉が行われなくする必要がある。ここで、トウモロコシなどの、雄花と雌花が離れた植物では、雄花を人為的に刈り取ることにより、自家受粉を避けることができる。しかし、この作業は、多大な人的労力を有し非常に手間となる。また、イネに代表される自殖性植物では、多数の花が集合していたり、雄しべおよび雌しべが花弁を包み込んでいたりする。そのため、人為的に雄花を刈り取ることすら困難であり、自家受粉を避けることは非常に難しい。

[0004] したがって、雑種強勢を利用した交配を行うためには、正常な花粉形成ができない、いわゆる雄性不稔体を利用することが望ましい。事実、これまで、トマトやキュウリなどの多くの植物において、雄性不稔体が得られ、品種改良に利用されてきた。

[0005] しかし、一方、雄性不稔体が確立されていない植物品種もまた、多数、存在することも事実である。これらの植物において、雄性不稔体を、突然変異によって新たに得る場合、成果を偶然性に委ねざるをえないため、長期にわたる交配が必要となる。したがって、労力もコストも多大に必要となり、現在の農業において、その取り組みは現実

的に困難である。

- [0006] そこで、遺伝子組み換え技術を利用して、人為的に雄性不稔体を確立する試みが、これまでいくつか為されている

非特許文献1には、核内遺伝子による雄性不稔を人為的に引き起こす技術が開示されている。この技術では、ペニチュアにカルコンシンターゼのアンチセンス遺伝子を導入して、カルコンシンターゼの活性を抑制する。これにより、フラボノイドの生合成的前駆体であるカルコンの生合成が抑えられ、形質転換されたペニチュアは雄性不稔体となる。

- [0007] 非特許文献2には、毒性物質によりタバコのタペート組織を消失させることで、雄性不稔体を作成する技術が開示されている。この技術では、N-アセチル-L-オルニチンデアセチラーゼを転写・翻訳産物とする、argE遺伝子を、タペート組織において特異的に機能するTA29プロモーターに類似するDNA配列に融合させた形で、タバコに導入する。次に、このタバコに、毒性のないN-アセチル-L-フォスフィノスリシンを投与する。すると、葯において発現されたN-アセチル-L-オルニチンデアセチラーゼによって、N-アセチル-L-フォスフィノスリシンが脱アセチル化され、毒性のある、L-フォスフィノスリシンとなる。この毒性物質によって、タペート組織がネクロシスを起こして消失するため、形質転換されたタバコは、花粉が形成されない雄性不稔体となる。

- [0008] また、非特許文献3には、細胞質雄性不稔を人為的に引き起こす技術が開示されている。この技術では、コムギ由来の、RNAエディティングが行われないミトコンドリアatp9遺伝子を、タバコ細胞に導入する。これにより、不活性のATP9タンパク質が発現されて、ミトコンドリアに移行する。その結果、ミトコンドリアの機能が阻害されるため、形質転換されたタバコは雄性不稔体となる。

- [0009] さらに、非特許文献4には、RNAエディティングが行われないミトコンドリアatp9遺伝子のアンチセンス遺伝子を導入した別の形質転換タバコを作成し、これと、RNAエディティングが行われないミトコンドリアatp9遺伝子を導入した形質転換タバコとを交配することによって、次世代で稔性が回復する形質転換タバコを作成する技術が開示されている。

- [0010] また、従来から、植物において、植物特異的転写因子ファミリーとして、NACファミリーが知られている。シロイヌナズナにおいては、NACファミリーに属する遺伝子は現在までに100以上報告されている。これまでに単離されたNACファミリーは、茎頂分裂組織の形成・維持、花器官形成、側根形成等に必要な転写因子として報告されており、様々な機能を持つことが明らかになりつつある。しかし、NACファミリーが特異的に結合するシス配列等についてはわかっておらず、その機能の解析が待たれるところである(例えば、非特許文献5参照)。
- [0011] ところで、植物を異なる品種間で交配させ、農産物をハイブリッド化して優良品種を作出することが、現在一般的に行なわれている。これは、植物を異なる品種間で交配させ雑種を作ると、両親より優れた形質が子供に現れる雑種強勢を利用するものである。雑種強勢の利益を受けるためには、互いに異なった品種間で交配させる必要がある。このため、交配を行う品種において、自家受粉が行われないようにする必要がある。このような方法としては、雄性器官を人為的に除去する方法、人為的に交配する方法、花粉の成熟を阻害する化学物質を用いる方法等があるが、これらはその方法を利用できる植物が限られ、また、多大な人的労力を要し手間のかかる作業である。このため、雄性配偶子(花粉)の形成が不完全なため種子形成の不能により稔性を喪失した雄性不稔体を利用する方法が、広く用いられている。これまで、種々の植物において、突然変異により得られた雄性不稔体が品種改良に利用されている。また、雄性不稔体が確立されていない植物品種も多く、遺伝子組換え技術を利用して、人為的に雄性不稔体を確立する試みも報告されている(例えば、特許文献1、2参照)。特許文献1では、葯の裂開および花粉の成熟を制御する遺伝子DAD1の発現を制御することによる雄性不稔植物の作出方法が開示されている。
- [0012] 一方、葯の裂開を抑制する試みとしては、細胞毒性を有するバルナーゼを、葯特異的に遺伝子を発現させるTA56プロモーターに結合し、タバコに導入することによって、口辺細胞を人為的に殺したタバコの葯では、葯の裂開が起きなくなることが報告されている(例えば、非特許文献6参照)。また、非特許文献6では、裂開が起こるためには、口辺細胞は、細胞死を迎えるまでの間は十分機能的であることが必要であることが報告されている。しかし、葯の裂開における分子レベルでの知見は殆ど得

られていない。蒴の裂開が異常な突然変異体として、delayed-dehiscence 1、delayed-dehiscence 5、non-dehiscence 1、msH等比較的多数の突然変異体が知られている(例えば、非特許文献7参照)。しかしながら、蒴の裂開を制御する原因遺伝子として、これまでに明らかにされているものは、上記DAD1等数えるほどしかなく、その多くは未だに原因遺伝子が明らかにされていない。

[0013] さらに、トウモロコシのトランスポゾンEn-1/Spmで突然変異を誘発したシロイヌナズナ集団から蒴の裂開に異常が見られる突然変異体を単離し、原因遺伝子の同定を行ったことが報告されている(例えば、非特許文献8参照)。非特許文献8では、得られた突然変異体の表現型は、AtMYB26にトランスポゾンが挿入されることにより引き起こされるものであることが報告されている。

[0014] また、一般に、花はがく、花卉、雄しべ、雌しべの4つの器官からなり、花芽分裂組織を4つの同心円状領域、つまり、外側からwhorl1〜4に分けた場合、whorl1には4つのがく、whorl2には4つの花卉、whorl3には6つの雄しべ、whorl4には2つの心皮が融合した雌しべが作られる。これらの器官の形質は、花のホメオティック遺伝子によって決定されることが知られている(例えば、非特許文献9参照)。花のホメオティック遺伝子は、A、B、Cの3クラスに分類され、転写因子をコードしている。そのため、これらの遺伝子群の組み合わせによって、花芽分裂組織に形成される花器官の種類が決定される。すなわち、クラスAのみが働くのがくが、クラスAとBが協働すると花卉が、クラスBとCが協働すると雄しべが、クラスCのみが働く雌しべが形成される。したがって、ホメオティック遺伝子の機能が突然変異などで失われると、ある器官が他の器官の形質に転換する。このような変化はホメオティックな変換と呼ばれ、植物ではシロイヌナズナ等で花の器官形質決定に関与するホメオティック遺伝子が明らかになっている(例えば、非特許文献9参照)。

[0015] agamous遺伝子(以下「AG遺伝子」と称する)は、上記のクラスC遺伝子であり、AG遺伝子の機能が失われたAG変異体では、クラスAの機能が花の全領域に及び、雄しべが花卉に変化し、野生型では雌しべとなる領域に新しい花が作られ、花の形態は八重咲きとなることが知られている(例えば、非特許文献9参照)。

[0016] これまで、八重咲き植物体の作製を目的として花の形態を変化させる場合は、その



目的とする形質を有する植物の品種を掛け合わせる交配育種を行うのが一般的である。

[0017] また、近年、特定の遺伝子の働きを抑制する方法として、2本鎖RNAを細胞の中に入れ、その配列に相同な細胞のmRNAを分解するRNA干渉(RNAi)法が広く用いられるようになってきている。

[0018] 一方、本発明者は、任意の転写因子を転写抑制因子に転換するペプチドを種々見出している(例えば、特許文献3〜9、非特許文献10、11参照)。このペプチドは、Class II ERF (Ethylene Responsive Element Binding Factor)タンパク質や植物のジンクフィンガータンパク質(Zinc Finger Protein、例えばシロイヌナズナSUPERMANタンパク質等)から切り出されたもので、極めて単純な構造を有している。

[0019] さらに、本発明者は、種々の転写因子と上記ペプチドとを融合させた融合タンパク質(キメラタンパク質)をコードする遺伝子を植物体内に導入することを試みている。そして、これにより、転写因子が転写抑制因子に転換され、該転写因子が転写を促進する標的遺伝子の発現が抑制された植物体を生産することに成功している。

[特許文献1]

日本国公開特許公報「特開2000-300273公報」(公開日:平成12年(2000)10月31日)

[特許文献2]

日本国公開特許公報「特開2004-24108公報」(公開日:平成16年(2004)1月29日)

[特許文献3]

日本国公開特許公報「特開2001-269177公報」(公開日:平成13年(2001)10月2日)

[特許文献4]

日本国公開特許公報「特開2001-269178公報」(公開日:平成13年(2001)10月2日)

[特許文献5]

日本国公開特許公報「特開2001-292776公報」(公開日:平成13年(2001)10

月2日)

[特許文献6]

日本国公開特許公報「特開2001-292777公報」(公開日:平成13年(2001)10月23日)

[特許文献7]

日本国公開特許公報「特開2001-269176公報」(公開日:平成13年(2001)10月2日)

[特許文献8]

日本国公開特許公報「特開2001-269179公報」(公開日:平成13年(2001)10月2日)

[特許文献9]

国際公開第WO03/055903号パンフレット(公開日:平成15年(2003)7月10日)

[非特許文献1]

Ingrid M. van der Meer, Maïke E. Stam, Arjen J. van Tunen, Joseph N. M. Mol, and Antoine R. Stuitje. The Plant Cell, Vol 4, pp 253-262, March, 1992

[非特許文献2]

G. Kriete, K. Niehaus, A.M. Perlick, A. Puehler and I. Broer, The Plant Journal, Vol 9, pp 809-818, 1996

[非特許文献3]

Michel Hernould, Sony Suharsono, Simon Litvak, Alejandro Araya, and Armand Mouras., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 90, pp. 2370-2374, March, 1993

[非特許文献4]

Eduardo Zabaleta, Armand Mouras, Michel Hernould, Suharsono, and Alejandro Araya., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol 93, pp 11259-11263, October, 1996

[非特許文献5]

Xie,Q.,Frugis,G.,Colgan,D.,Chua,N-H., Genes Dev.14,3024-3036,2000

[非特許文献6]

Beals, T.P., Goldberg, R.B., The Plant Cell, Vol.9, 1527-1545, September, 1997

[非特許文献7]

日向康吉編著, 「花—性と生殖の分子生物学—」, 学会出版センター, p116-p117

[非特許文献8]

Steiner-Lange, S., Unte, U.S., Eckstein, L., Yang, C., Wilson, Z.A., Schmelzer, E., Dekker, K., Saedler, H., The Plant Journal (2003) 34, 519-528

[非特許文献9]

酒井一著, 「植物の形を決める分子機構」, 秀潤社, 150-155頁

[非特許文献10]

Ohta, M., Matsui, K., Hiratsu, K., Shinshi, H. and Ohme-Takagi, M., The Plant Cell, Vol.13, 1959-1968, August, 2001

[非特許文献11]

Hiratsu, K., Ohta, M., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., FEBS Letters 514 (2002) 351-354

[0020] しかし、従来、花器形成に関与する遺伝子の転写を抑制することによって、不稔性植物体を生産する技術は知られていない。

[0021] また、上記特許文献1では、葯の裂開が起こらないことと、花粉が稔性を有しないことは同時に起こっている。しかし、花粉の稔性の有無にかかわらず、葯の裂開が起こらなければ、雑種強勢を利用した交配において、自家受粉を避けることができる。

[0022] また、従来より用いられている花粉が稔性を有さない雄性不稔体を利用する方法は、結実すると自動的に雑種になるので、雑種第1代を作成するのに有効な方法である。しかし、次世代でも不稔であると結実しないので、次世代では稔性を回復しなければならない。これに対して、葯の裂開は抑制されるが、花粉は稔性を有しているような場合は、花粉自体に生殖能を残しつつ、自家受粉が起きない植物を作成することができ、育種上非常に有用である。このような葯の裂開の抑制を、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとのキメラタンパク質を生産させることによって行なう技術は知られていない。

- [0023] また、従来の交配育種による方法では、目的とする形質を有する植物を生産するためには、長い年月と、熟練者の経験が必要である。したがって、短期間で簡便、確実に八重咲き植物体を得ることは非常に困難である。
- [0024] さらに、上記RNAi法によってAG遺伝子の機能を抑制し、八重咲き植物体を得ることも考えられるが、RNAi法には、遺伝子の発現を抑制する場合にターゲットとする部位の決定が困難であり、試行錯誤が必要であること、コンストラクトの構築が難しいこと、細胞によってはトランスフェクションの効率が低く、RNA干渉の効果が限定されること、等の種々の問題点がある。したがって、RNAi法によって八重咲き植物体を短期間で簡便、確実に得ることは非常に困難である。
- [0025] 本発明は、上記の問題点に鑑みなされたものであって、その目的は、花器形成に関与する遺伝子の転写を抑制することによって、植物を不稔化する、不稔性植物体の生産方法を提供することにある。
- [0026] また、本発明の目的は、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとのキメラタンパク質を生産させることによって、葯の裂開が抑制された不稔性植物体を生産する方法を提供することにある。
- [0027] さらに、本発明の目的は、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子を転写抑制因子に転換し、上記転写因子の標的遺伝子の転写を抑制することにより、短期間で簡便、確実に花の形態を八重咲きにする不稔性植物体を生産する方法を提供することにある。

#### 発明の開示

- [0028] 本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子の1つであるAPETALA3タンパク質を転写抑制因子に転換することによって、花卉および雄しべが形成されない雄性不稔植物体を生産できることを見出し、本発明を完成させるに至った。
- [0029] すなわち、本発明にかかる不稔性植物体の生産方法は、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、植物体を不稔化

することを特徴としている。

[0030] また、本発明にかかる不稔性植物体の生産方法は、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制することを特徴としている。

[0031] また、本発明に係る不稔性植物体の生産方法では、上記花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子が、雄しべまたは雌しべの形成に関与する転写因子であることが好ましい。

[0032] 上記構成によれば、得られる植物体は、種子が形成されない不稔性植物体となる。したがって、複雑な遺伝子組み替え技術を利用することなく、非常に簡便に目的の植物を不稔性植物体とすることができる。

[0033] また、本発明に係る不稔性植物体の生産方法では、不稔性植物体は、少なくとも雄しべの形成が阻害されたものであることが好ましい。

[0034] また、本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、NACファミリータンパク質の1つであるAt2g46770遺伝子座においてコードされるタンパク質に、任意の転写因子を転写抑制因子に転換するペプチドを融合させて、植物体内で発現させると、葯の裂開が完全に起こらなくなるか、または、不完全にしか起こらなくなることを見出した。また、これにより、このNACファミリータンパク質 (At2g46770遺伝子座においてコードされるタンパク質、以下、適宜「NACAD1」(NAC involving to Anther Development)と称する) が、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であることを初めて明らかにし、本発明を完成させるに至った。

すなわち、本発明に係る不稔性植物体の生産方法では、上記雄しべまたは雌しべの形成に関与する転写因子が、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であって、上記転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させることにより、葯の裂開を抑制することが好ましい。

[0035] また、本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であって、MYBドメインを有する転写因子

の1つであるMYB26タンパク質に、転写因子を転写抑制因子に転換するペプチドを融合させて、植物体内で発現させると、蒴の裂開が完全に起こらなくなるか、または、不完全にしか起こらなくなることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0036] すなわち、本発明に係る不稔性植物体の生産方法では、上記蒴の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子が、MYBドメインを有する転写因子であって、上記転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させ、蒴の裂開に関与する遺伝子の転写を抑制することが好ましい。上記植物体は、さらに、雌性器官が稔性を有していることが好ましい。また、上記植物体はさらに花粉自体が稔性を有することが好ましい。

[0037] これにより、上記キメラタンパク質は、上記転写因子が標的とする遺伝子の転写を効果的に抑制することができる。それゆえ、上記キメラタンパク質が生産された植物体の蒴の裂開が抑制されるという効果を奏する。

[0038] また、本発明者は、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子を転写抑制因子に転換し、上記転写因子の標的遺伝子の転写を抑制することにより、八重咲き植物体を短期間で簡便、確実に生産することができることを初めて明らかにし、本発明を完成させるに至った。

[0039] すなわち、本発明にかかる不稔性植物体の生産方法は、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させることにより、花の形態を八重咲きにすることを特徴としている。

[0040] 上記構成によれば、上記転写因子を転写抑制因子に転換することができ、植物体内では、上記転写因子の標的遺伝子の転写が抑制される。また、上記転写因子の標的遺伝子の転写を抑制するという形質は、ドミナントであるので、上記キメラタンパク質の方が上記転写因子よりも優勢的に働いて、標的遺伝子の転写を抑制する。したがって、短期間で、簡便、確実に八重咲き植物体を生産することができる。

[0041] また、上記構成によれば、得られる八重咲き植物体は、種子が形成されない不稔性植物体となる。したがって、複雑な遺伝子組み替え技術を利用することなく、目的の植物を非常に簡便に不稔性植物体とすることができる。

- [0042] また、上記不稔性植物体の生産方法は、上記転写因子をコードする遺伝子と上記機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいてもよい。
- [0043] また、上記不稔性植物体の生産方法は、さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいてもよい。
- [0044] 上記構成によれば、上記機能性ペプチドが付加されたカセットベクターに上記転写因子の遺伝子を組み込み、植物細胞に導入するだけで、上記キメラタンパク質を植物細胞内で発現させることができ、上記キメラタンパク質により転写因子の標的遺伝子の転写を容易に抑制することができる。したがって、短期間に、簡便、確実に不稔性植物体を生産することができる。
- [0045] 上記転写因子は、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることを特徴としている。(a)配列番号134に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号134に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する機能を有するタンパク質。
- [0046] また、上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることが好ましい。(c)配列番号135に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。(d)配列番号135に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子。
- [0047] 上記転写因子は、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることが好ましい。(a)配列番号136に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質。
- [0048] また、上記転写因子は、配列番号136に示されるアミノ酸配列に対して50%以上の相同性を有し、且つ、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有する

タンパク質であってもよい。

- [0049] また、上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることが好ましい。(c)配列番号137に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。(d)配列番号137に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子をコードする遺伝子。
- [0050] また、上記転写因子は、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることが好ましい。(a)配列番号138に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号138に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質。
- [0051] また、上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることが好ましい。(c)配列番号139に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。(d)配列番号139に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、且つ、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子をコードする遺伝子。
- [0052] また、上記転写因子は、以下の(a)または(b)記載のタンパク質であることが好ましい。(a)配列番号140に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。(b)配列番号140に示されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。
- [0053] また、上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)または(d)記載の遺伝子を用いることが好ましい。
- (c)配列番号141に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。
- (d)配列番号141に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ、雄しべおよび雌しべの形成



に關与するタンパク質をコードする遺伝子。

[0054] 上記構成によれば、上記転写因子は上記機能性ペプチドにより転写抑制因子に転換され、上記転写因子の標的遺伝子の転写が抑制される。したがって、短期間に、簡便、確実に八重咲き植物体を生産することができる。

[0055] また、本発明にかかる葯の裂開が制御された植物体の生産方法は、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質をコードする遺伝子、

(a)配列番号136に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b)配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、葯の裂開に關与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質、

或いは、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子、

(c)配列番号137に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子、

(d)配列番号137に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、葯の裂開に關与する遺伝子の転写を促進する転写因子をコードする遺伝子を用いることを特徴としている。

[0056] また、上記機能性ペプチドは、次に示す式(1)～(4)

(1)X1-Leu-Asp-Leu-X2-Leu-X3

(但し、式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を示し、X2はAsnまたはGluを示し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(2)Y1-Phe-Asp-Leu-Asn-Y2-Y3

(但し、式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を示し、Y2はPheまたはIleを示し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(3)Z1-Asp-Leu-Z2-Leu-Arg-Leu-Z3

(但し、式中、Z1はLeu、Asp-LeuまたはLeu-Asp-Leuを示し、Z2はGlu、GlnまたはAspを示し、Z3は0～10個のアミノ酸残基を示す。)

(4)Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leu

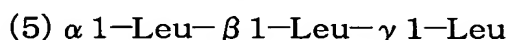
(但し、式中、Z4はGlu、GlnまたはAspを示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであることが好ましい。

[0057] また、上記機能性ペプチドは、配列番号1〜17のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることが好ましい。

[0058] また、上記機能性ペプチドは、以下の(e)または(f)記載のペプチドであってもよい。(e)配列番号18または19に示されるアミノ酸配列を有するペプチド。(f)配列番号18または19に示されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列を有するペプチド。

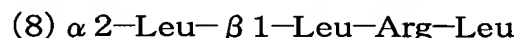
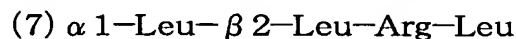
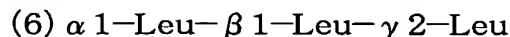
[0059] また、上記機能性ペプチドは、次に示す式(5)



(但し、式中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、ThrまたはSerを示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、SerまたはHisを示し、 $\gamma 1$ は、Arg、Gln、Asn、Thr、Ser、His、LysまたはAspを示す。)

で表されるアミノ酸配列を有するものであってもよい。

[0060] また、上記機能性ペプチドは、次に示す式(6)〜(8)



(但し、各式中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、ThrまたはSerを示し、 $\alpha 2$ は、Asn、Glu、Gln、ThrまたはSerを示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、SerまたはHisを示し、 $\beta 2$ はAsn、Arg、Thr、SerまたはHisを示し、 $\gamma 2$ はGln、Asn、Thr、Ser、His、LysまたはAspを示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであってもよい。

[0061] また、上記機能性ペプチドは、配列番号20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、38、39、40または152に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。

[0062] また、上記機能性ペプチドは、配列番号36または37に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであってもよい。

[0063] 上記機能性ペプチドは、上記式のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するペプ

チドまたは上記配列番号に示されるいずれかのペプチドであり、その多くは極めて短いペプチドであるため、合成が容易であり、上記転写因子の標的遺伝子の転写抑制を効率的に行うことができる。また、上記機能性ペプチドは、機能的に重複(リダンダント)する他の転写因子の活性に優先して標的遺伝子の発現を抑制する機能を有している。それゆえ、標的遺伝子の発現を効果的に抑制できるという効果を奏する。

[0064] また、本発明にかかる植物体は、上記生産方法により生産された不稔性植物体であることを特徴としている。上記不稔性植物体には、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれることが好ましい。

[0065] また、本発明にかかる不稔性植物体の生産キットは、上記の生産方法を行うためのキットであって、花器形成、雄しべまたは雌しべの形成、葯の裂開、または雄しべおよび雌しべの形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを少なくとも含むことを特徴としている。上記不稔性植物体の生産キットは、さらに、上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含んでもよい。

[0066] 本発明のさらに他の目的、特徴、および優れた点は、以下に示す記載によって十分わかるであろう。また、本発明の利益は、添付図面を参照した次の説明で明白になるであろう。

#### 図面の簡単な説明

[0067] [図1(a)]実施例で組換え発現ベクターp35S::APETALA3SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの成長した植物体の全体を示す図である。

[図1(b)]実施例で組換え発現ベクターp35S::APETALA3SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの成長した植物体の先端を拡大した図である。

[図1(c)]実施例で組換え発現ベクターp35S::APETALA3SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの成長した植物体の花器を拡大した図である。

[図2]実施例において用いる組換え発現ベクターを構築するための構築用ベクターの構築方法を示す工程図である。

[図3]実施例において用いる構築用ベクターp35SGに、転写抑制転換ペプチドSR

DXをコードする遺伝子とNACAD1遺伝子とを組み込む工程図である。

[図4]実施例において用いる構築用ベクターp35SGに、転写抑制転換ペプチドSRDXをコードする遺伝子とMYB26遺伝子とを組み込む工程図である。

[図5]実施例において用いる構築用ベクターp35SGに、転写抑制転換ペプチドSRDXをコードする遺伝子とAG遺伝子とを組み込む工程図である。

[図6]形質転換用ベクターpBIGCKHの構築方法を示す工程図である。

[図7(a)]実施例で組換え発現ベクターpBIG-NACAD1SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの蒴の形状を示す図である。

[図7(b)]野生型のシロイヌナズナの蒴の形状を示す図である。

[図8]実施例で組換え発現ベクターpBIG-NACAD1SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナ(右側)と、野生型のシロイヌナズナ(左側)を示す図である。

[図9(a)]実施例で組換え発現ベクターpBIG-NACAD1SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの「収穫された種子の質量 $\times 100$  / 種子以外の地上部の乾燥重量」の階級値に対し、個体数をプロットしたグラフである。

[図9(b)]野生型のシロイヌナズナの「収穫された種子の質量 $\times 100$  / 種子以外の地上部の乾燥重量」の階級値に対し、個体数をプロットしたグラフである。

[図10]実施例で、pBIG-NACAD1SRDXにより形質転換され、蒴の裂開が抑制された植物体において、蒴内の花粉を取り出して受粉させた場合に結実するかを調べた結果を示す図である。

[図11(a)]野生型のシロイヌナズナの蒴の形状を示す図である。

[図11(b)]実施例で組換え発現ベクターpBIG-MYB26SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの蒴の形状を示す図である。

[図12(a)]野生型のシロイヌナズナの「(結実したさやの数 / 開花した花の数)  $\times 100$ 」の階級値に対し、個体数をプロットしたグラフである。

[図12(b)]実施例で組換え発現ベクターpBIG-MYB26SRDXにより形質転換されたシロイヌナズナの「(結実したさやの数 / 開花した花の数)  $\times 100$ 」をプロットしたグラフである。

[図13(a)]pBIG-AGSRDXで形質転換し、完全な八重咲きとなったシロイヌナズナの

花を示す図である。

[図13(b)]花の形態が八重咲きとなったシロイヌナズナの全体を表す図である。

[図14(a)]野生型のシロイヌナズナの花を示す図である。

[図14(b)]AG変異体のシロイヌナズナの花を示す図である。

[図15]組換え発現ベクターpBIG-AGSRDXにより形質転換され、不完全な八重咲きとなったシロイヌナズナ花を示す図である。

[図16]組換え発現ベクターpBIG-AGSRDXにより形質転換され、野生型に近い形態となったシロイヌナズナの花を示す図である。

### 発明を実施するための最良の形態

[0068] 以下、本発明の実施の一形態について、図1(a)～図16に基づいて説明する。なお、本発明はこれに限定されるものではない。

[0069] 本発明は、不稔性植物体を生産する技術であって、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させるものである。これによって得られる植物体では、正常な花粉形成ができないため、本発明により、雄性不稔植物体を生産することができる。

[0070] ここで、正常な花粉形成ができなくなることは、次のようにして起こる。すなわち、上記キメラタンパク質における上記転写因子由来のDNA結合ドメインが、花器形成に関与すると推定される標的遺伝子に結合する。上記転写因子は転写抑制因子に転換され、標的遺伝子の転写が抑制される。これにより、例えば雄しべの形成が阻害されるなどして、正常な花粉形成ができない雄性不稔植物体を得ることができる。

[0071] 本発明の生産方法で生産される植物の雄性不稔体(本雄性不稔体)は、正常な花粉形成ができないものである。すなわち、本雄性不稔体の例には、雄しべの形成が阻害され、花粉がまったく形成されないものや、雄しべは形成されるが、葯が形成されないために、花粉が形成されないものや、雄しべも葯も形成されるが、形成される花粉の量が少なく、葯の開裂に至らないものや、形成された花粉が肥大化して互にくっついてしまい、全く飛散しないもの、などがある。

[0072] なお、本雄性不稔体では、雌しべは稔性を有している。このため、本雄性不稔体に

他種の花粉を授粉できる。したがって、雑種強勢を利用した交配により、一代雑種を得ることが出来る。

[0073] また、本雄性不稔体では、正常な花粉形成ができなくなることに加えて、他の組織の形成が正常に行われなくなっているもよい。例えば、本雄性不稔体は、花卉や萼などが通常とは異なる形に形成されるものや、あるいは全く形成されていないものでもよい。例えば、花卉や萼がまったく形成されなければ、雌しべが露出するため、他種の花粉を授粉する際の手間(萼や花卉を除去する等)を簡略化できる。

[0074] また、本発明は、植物体の葯の裂開を抑制する技術であって、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させる。これによって得られる植物体では、葯の裂開に関与する遺伝子の転写が抑制され、葯の裂開が抑制された植物体を生産することができる。

[0075] ここで、葯の裂開は次のように抑制される。すなわち、上記キメラタンパク質における上記転写因子由来のDNA結合ドメインが、葯の裂開に関与すると推定される標的遺伝子に結合する。上記転写因子は転写抑制因子に転換され、標的遺伝子の転写が抑制される。これにより葯の裂開に関与すると推定されるタンパク質の生成が減少し、その結果、得られる植物体の葯の裂開を抑制することができる。

[0076] また、本発明は、植物体の葯の裂開を抑制する技術であって、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であってMYBドメインを有する転写因子と、転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させる。これによって得られる植物体では、葯の裂開に関与する遺伝子の転写が抑制され、葯の裂開が抑制された植物体を生産することができる。

[0077] また、例えば現在遺伝子の働きを抑える方法として一般的なRNAi法の場合、細胞によってはトランスフェクションの効率が低く、効果が限定される場合もある。従って、RNAi法を用いる場合、ターゲットとする部位の決定が難しく試行錯誤が必要である。また、コンストラクトの構築が難しい。本発明にかかる方法では、上記転写因子をコードする遺伝子に上記機能性ペプチドをコードする遺伝子を結合したキメラ遺伝子を植物体に導入することによって、非常に簡便に目的の植物の葯の裂開を抑制するこ

とが可能となる。

[0078] 本発明にかかる生産方法で生産される葯の裂開が抑制された植物体には、葯の裂開が完全に起こらない植物体及び葯の裂開が不完全にしか起こらない植物体が含まれる。ここで葯とは雄しべ(おしべ)の一部で、花粉をつくる袋状の部分である。閉花受精をするもの(例:マメ科)では、花粉が葯内で発芽し、繊維状細胞層の発達をみない柔らかな葯壁を通して花粉管を伸長させるが、一般に葯は裂開して花粉を葯の外に放出する。葯の裂開は、口辺細胞が細胞死を起こし、そこで葯壁が切れることによって起こる。また、口辺細胞が切れただけでは葯は口を開かず、花粉が放出されるためには葯壁が収縮して反りかえることが必要である。本発明でいう葯の裂開が抑制された植物体とは、口辺細胞が切れただけの植物体であってもよく、口辺細胞が切れ且つ葯壁が反りかえって葯が口を開いた植物体であってもよい。なお、口辺細胞とは、葯が口を開く部分にあたる、一層の小さな細胞からなる組織である。

[0079] なお、本発明の葯の裂開が抑制された植物体では、雌性器官(雌しべ)は、稔性を有している。これにより、本発明の葯の裂開が抑制された植物体に他種の花粉を受粉できる。したがって、雄性器官を人為的に除去したり、人為的に交配させるという手間をかけずに、雑種強勢を利用した交配により、雑種第1代(F1)品種を得ることができる。

[0080] また、本発明の葯の裂開が抑制された植物体では、葯の裂開が抑制されていればよく、花粉自体は稔性を有していてもよいし、稔性を有していなくてもよいが、花粉自体が稔性を有していることがより好ましい。これにより、花粉自体には生殖能を残しつつ、自家受粉が起きない植物体を生産することが可能となり、育種等に有用である。すなわち、花粉自体が稔性を有していない雄性不稔体では、それ自身の花粉が利用できないので、自殖によるホモ接合性の個体を作出、維持することができない。ヘテロ接合性の個体を自家受粉することにより、ホモ接合性の個体を作出することはできるが、かかる場合もホモ接合性の個体は1/4しか得られない。これに対し、花粉自体には生殖能を残すことにより、ホモ接合性の個体を作出、維持することが可能となり、育種への応用が考えられる。

[0081] また、本発明は、八重咲き植物体を生産する技術であって、雄しべおよび雌しべの

形成に関与する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させることにより、八重咲き植物体を生産するものである。

[0082] 上記キメラタンパク質を生産させる方法では、上記転写因子は、上記機能性ペプチドにより転写抑制因子に転換される。そのため、上記キメラタンパク質における転写因子由来のDNA結合ドメインが、転写因子の標的遺伝子に結合すると、転写因子の標的遺伝子の転写が抑制される。その結果、雄しべおよび雌しべの形成に関与する遺伝子の機能が失われ、上述したクラスAの機能が花の全領域に及ぶため、雄しべが花弁に変化し、野生型では雌しべとなる領域に新しい花が作られ、八重咲き植物体が形成される。すなわち、図13(A)に示すように、外側からがく、花弁、花弁の順で花が繰り返し形成される。

[0083] また、上記キメラタンパク質が上記転写因子の標的遺伝子の転写を抑制するという形質は、ドミナントである。すなわち、雄しべおよび雌しべの形成に関与する正常な遺伝子が存在していても、転写因子の標的遺伝子の転写が抑制された変異型の遺伝子の方が優勢に発現する。つまり、上記キメラタンパク質の方が上記転写因子よりも優勢的に働いて標的遺伝子の転写を抑制する。

[0084] したがって、短期間で、簡便、確実に、八重咲き植物体を生産することができる。また、得られる八重咲き植物体は、種子が形成されない不稔性植物体となる。上記不稔性植物体には、雄しべも雌しべも全く形成されない完全不稔性植物体の他、不完全な雄しべ様器官および／または雌しべ様器官が形成されるものの、種子の形成が抑制される不稔性植物体も含まれる。

[0085] 上記不稔性植物体では、種子が形成されない。また、上記完全不稔性植物体では、花粉の離散が生じない。したがって、遺伝子組み換え植物の環境への拡散を防止することができる。

[0086] 以降の説明では、本発明にかかる不稔性植物体の生産方法に用いられるキメラタンパク質、本発明にかかる植物体の生産方法の一例、これにより得られる植物体とその有用性、並びにその利用について、それぞれ説明する。

[0087] (I) 本発明で用いられるキメラタンパク質



上述したように、本発明で用いられるキメラタンパク質は、花器形成に関与する遺伝子、雄しべまたは雌しべの形成に関与する遺伝子、葯の裂開に関与する遺伝子、または、雄しべおよび雌しべの形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたものである。葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子は、MYBドメインを有する転写因子であってもよい。

[0088] また、本発明で用いられるキメラタンパク質は、内在性の遺伝子に対して、優勢に作用するものである。すなわち、本発明にかかるキメラタンパク質は、植物が二倍体や複二倍体であったり、あるいは植物に機能重複遺伝子が存在したりしても、該当する転写因子が制御する、花器形成に関わる遺伝子、雄しべまたは雌しべの形成に関与する遺伝子、葯の裂開に関与する遺伝子、または雄しべおよび雌しべの形成に関与する遺伝子の発現を、一様に抑制できる。そのため、遺伝子導入可能なあらゆる植物を、不稔性植物体、雄性不稔体、葯の裂開が抑制された植物体または八重咲き植物体に容易に形質転換することが可能となる。

[0089] 以下では、上記転写因子および機能性ペプチドそれぞれについて説明する。

[0090] (I-1-a) 花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子

本発明で用いられる転写因子は、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であれば特に限定されるものではない。かかる転写因子は多くの植物に保存されている。したがって、本発明で用いられる転写因子には、種々の植物に保存されている同様の機能を有するタンパク質が含まれる。

[0091] このような転写因子としては、MADS Boxを含んだ転写因子であるAPETALA3タンパク質やPISTILLATAタンパク質があるが、これらに限定されるものではない。

[0092] 本発明で用いられる転写因子の代表的な一例としては、例えば、APETALA3タンパク質を挙げることができる。APETALA3タンパク質は、配列番号134に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり、上述したように、花器形成に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であることが知られている。また、シロイヌナズナでは、このAPETALA3タンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、APETALA3遺伝子と称する)の変異株において、花卉と雄しべの形成が阻害されることが知られて

いる(Thomas Jack, Laura L. Brockman, and Elliot M. Meyerowitz., Cell, Vol 68, pp 683-697, February, 1992を参照のこと)。本発明では、例えば、このAPETALA3タンパク質に後述する機能性ペプチドを融合させることにより、転写因子であるAPETALA3タンパク質を転写抑制因子に転換させる。

[0093] 本発明で用いられる転写因子としては、配列番号134に示されるアミノ酸配列を有するAPETALA3タンパク質に限定されるものではなく、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する機能を有する転写因子であればよい。具体的には、配列番号134に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、上記機能を有していれば本発明にて用いることができる。なお、上記の「配列番号134に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

[0094] また、本発明で用いられる、花器形成に関わる遺伝子の転写を促進する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられる。そのため、雄性不稔体を生産したい個々の植物体において、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する固有の転写因子やその遺伝子を、必ずしも単離する必要はない。すなわち、後述する実施例で示す、シロイヌナズナで構築したキメラタンパク質を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において簡便に雄性不稔体を生産できると考えられる。

[0095] 本発明で用いられるキメラタンパク質を生産させる際には、後述するように、公知の遺伝子組換え技術を好適に用いることができる。そこで、本発明にかかる植物体の生産方法には、上記転写因子をコードする遺伝子も好適に用いることができる。

[0096] 上記転写因子をコードする遺伝子としては特に限定されるものではないが、具体的な一例としては、例えば、転写因子としてAPETALA3タンパク質を用いる場合には、このAPETALA3遺伝子を挙げることができる。APETALA3遺伝子の具体的な一例としては、例えば、配列番号135に示される塩基配列をオープンリーディングフ

レーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。

[0097] もちろん、本発明で用いられるAPETALA3遺伝子、または、転写因子をコードする遺伝子としては、上記の例に限定されるものではなく、配列番号135に示される塩基配列と相同性を有する遺伝子であつてもよい。具体的には、例えば、配列番号135に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジントな条件でハイブリダイズし、かつ、上記転写因子をコードする遺伝子等を挙げることができる。なお、ここでストリンジントな条件でハイブリダイズするとは、60℃で2×SSC洗浄条件下で結合することを意味する。

[0098] 上記ハイブリダイゼーションは、J. Sambrook et al. Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory(1989)に記載されている方法等、従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジエンシーは高くなる(ハイブリダイズしがたくなる)。

[0099] 上記転写因子をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されるものではなく、従来公知の方法により、多くの植物から単離することができる。例えば、既知の転写因子の塩基配列に基づき作製したプライマー対を用いることができる。このプライマー対を用いて、植物のcDNA又はゲノミックDNAを鋳型としてPCRを行うこと等により上記遺伝子を得ることができる。また、上記転写因子をコードする遺伝子は、従来公知の方法により化学合成して得ることもできる。

[0100] (I-1-b) 葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子

本発明で用いられる転写因子は、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であれば特に限定されるものではない。一般に葯は裂開して花粉を葯の外に放出する。従って、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子は多くの植物に保存されている。したがって、本発明で用いられる転写因子には、種々の植物に保存されている同様の機能を有する転写因子が含まれる。

[0101] 本発明で用いられる転写因子の代表的な一例としては、例えば、NACAD1タンパク質を挙げることができる。NACAD1タンパク質は、配列番号136に示されるアミノ酸配列を有するタンパク質であり、上述したように、シロイヌナズナのNACファミリータンパク質の1つである。本発明では、例えば、このNACAD1タンパク質に後述する

機能性ペプチドを融合させることにより、転写因子であるNACAD1タンパク質を転写抑制因子に転換させる。

- [0102] 本発明で用いられる転写因子としては、配列番号136に示されるアミノ酸配列を有するNACAD1タンパク質に限定されるものではなく、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であればよい。具体的には、配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、上記機能を有していれば本発明にて用いることができる。なお、上記の「配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。
- [0103] また上記転写因子としては、配列番号136に示されるアミノ酸配列に対して、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%または70%以上の相同性を有するタンパク質であって、且つ、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質も含まれる。なおここで「相同性」とは、アミノ酸配列中に占める同じ配列の割合であり、この値が高いほど両者は近縁であるといえる。上記転写因子としては、例えば、上記相同性が52%であって、配列番号136に示されるアミノ酸配列を有するNACAD1タンパク質と同じ機能を持つNAC因子が挙げられる。
- [0104] 本発明で用いられるキメラタンパク質を生産させる際には、後述するように、公知の遺伝子組換え技術を好適に用いることができる。そこで、本発明にかかる植物体の生産方法には、上記転写因子をコードする遺伝子も好適に用いることができる。
- [0105] 上記転写因子をコードする遺伝子としては特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、上記転写因子のアミノ酸配列に対応するものであればよい。具体的な一例としては、例えば、転写因子としてNACAD1タンパク質を用いる場合には、このNACAD1タンパク質をコードする遺伝子(説明の便宜上、NACAD1遺伝子と称する)を挙げることができる。NACAD1遺伝子の具体的な一例としては、例えば、配列番号137に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリ

ヌクレオチドを挙げることができる。

[0106] もちろん、本発明で用いられるNACAD1遺伝子、または、転写因子をコードする遺伝子としては、上記の例に限定されるものではなく、配列番号137に示される塩基配列と相同性を有する遺伝子であってもよい。具体的には、例えば、配列番号137に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジエントな条件でハイブリダイズし、かつ、上記転写因子をコードする遺伝子等を挙げることができる。なお、「ストリンジエントな条件でハイブリダイズする」の意味については上述の通りである。

[0107] 上記ハイブリダイゼーションは、上述のように、従来公知の方法で行うことができる。上記転写因子をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されるものではなく、上述のように、従来公知の方法により、多くの植物から単離することができる。また、上記転写因子をコードする遺伝子は、上述のように、従来公知の方法により化学合成して得ることもできる。

[0108] (I-1-c) 葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であってMYBドメインを有する転写因子

本発明で用いられる転写因子は、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であって、MYBドメインを有する転写因子であれば特に限定されるものではない。ここで、MYBドメインとは、がん遺伝子の1つであるmyb遺伝子の産物と相同性を有する約50アミノ酸残基を1つの単位とするドメインをいう。かかるMYBドメインを持つ転写因子はMYB転写因子ファミリーとよばれ、MYBドメインは動物及び植物の多くの種において保存されている。本発明で用いられる転写因子は、かかるMYB転写因子ファミリーに属する転写因子であって、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であればよい。一般に葯は裂開して花粉を葯の外に放出する。したがって、本発明で用いられる転写因子には、種々の植物に保存されている同様の機能及び同様のドメインを有する転写因子が含まれる。

[0109] このような転写因子としてはシロイヌナズナMYB26タンパク質、イネNP\_916576.1 (GenBankアクセッション番号)によりコードされるタンパク質等を挙げることができるが、上記転写因子はこれらに限定されるものではない。

[0110] 本発明で用いられる転写因子の代表的な一例としては、シロイヌナズナMYB26タンパク質を挙げることができる。MYB26タンパク質は、例えば、配列番号138に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質を挙げることができ、上述したように、シロイヌナズナのMYB転写因子ファミリーの1つである。なお、特に高等生物では、可変スプライシングの結果生じるスプライシングバリエントが複数存在することが知られており、MYB26タンパク質でも、複数のスプライシングバリエントが存在する。従って、上記MYB26タンパク質には、配列番号138に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質に限られず、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有する転写因子である限り、かかるスプライシングバリエントも含まれる。本発明では、例えば、このMYB26タンパク質に後述する機能性ペプチドを融合させることにより、転写因子であるMYB26タンパク質を転写抑制因子に転換させる。

[0111] なお、MYB26タンパク質が標的とする、薬の裂開に関与する遺伝子については明らかにされていないが、この転写因子MYB26が標的とする遺伝子は、薬におけるリグニン合成を担う酵素等の遺伝子であることが予想されている。すなわちMYB26転写因子は、薬におけるリグニン合成を担う酵素等の遺伝子発現を正に制御していることが予想される。リグニン合成と薬の開裂との関係については、薬壁の内被細胞がリグニン化と脱水とによって収縮することにより、薬はストミウムを中心に左右に開くことが考えられる。従って、本発明で用いられる転写因子が標的とする遺伝子が、リグニン合成を担う酵素等の遺伝子である場合には、本発明で用いられる転写因子は、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であり、且つ、リグニン合成を担う酵素等の遺伝子発現を正に制御している転写因子であるということができる。

[0112] 本発明で用いられる転写因子としては、配列番号138に示されるアミノ酸配列からなるMYB26タンパク質に限定されるものではなく、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進するMYBファミリー転写因子であればよい。具体的には、配列番号138に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質であっても、上記機能及びMYBドメインを有していれば本発明にて用いることができる。なお、上記の「配列番号138に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／

又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

- [0113] また上記転写因子としては、配列番号138に示されるアミノ酸配列に対して、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%または70%以上の相同性を有するタンパク質であって、且つ、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能及びMYBドメインを有するタンパク質も含まれる。なおここで「相同性」とは、アミノ酸配列中に占める同じ配列の割合であり、この値が高いほど両者は近縁であるといえる。
- [0114] また、本発明で用いられる、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であってMYBドメインを有する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられる。そのため、葯の裂開を抑制したい個々の植物体において、かかる転写因子やかかる転写因子をコードする遺伝子を必ずしも単離する必要はない。すなわち、後述する実施例で示す、シロイヌナズナで構築したキメラタンパク質をコードする遺伝子を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において簡便に葯の裂開が抑制された植物体を生産することができる。
- [0115] 本発明で用いられるキメラタンパク質を生産させる際には、後述するように、公知の遺伝子組換え技術を好適に用いることができる。そこで、本発明にかかる植物体の生産方法には、上記転写因子をコードする遺伝子も好適に用いることができる。
- [0116] 上記転写因子をコードする遺伝子としては特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、上記転写因子のアミノ酸配列に対応するものであればよい。具体的な一例としては、例えば、転写因子としてMYB26タンパク質を用いる場合には、このMYB26タンパク質をコードする遺伝子（説明の便宜上、MYB26遺伝子と称する）を挙げることができる。MYB26遺伝子の具体的な一例としては、例えば、配列番号139に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム(ORF)として含むポリヌクレオチドを挙げることができる。
- [0117] もちろん、本発明で用いられるMYB26遺伝子、または、転写因子をコードする遺伝子としては、上記の例に限定されるものではなく、配列番号139に示される塩基配列と相同性を有する遺伝子であってもよい。具体的には、例えば、配列番号139に

示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、上記転写因子をコードする遺伝子等を挙げることができる。なお、「ストリンジェントな条件でハイブリダイズする」の意味については上述の通りである。

[0118] 上記ハイブリダイゼーションは、上述のように、従来公知の方法で行うことができる。上記転写因子をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されるものではなく、上述のように、従来公知の方法により、多くの植物から単離することができる。また、上記転写因子をコードする遺伝子は、上述のように、従来公知の方法により化学合成して得ることもできる。

[0119] (I-1-d) 雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子

本発明で用いられる転写因子は、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子であれば、特に限定されるものではない。一実施形態において、本発明で用いられる転写因子は、配列番号140に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、または配列番号140に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質の変異体である。配列番号140に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質は、上記AG遺伝子がコードする転写因子であり、雄しべおよび雌しべの形成に関与する。

[0120] 変異体としては、欠失、挿入、逆転、反復、およびタイプ置換(例えば、親水性の残基の別の残基への置換、しかし通常は強く親水性の残基を強く疎水性の残基には置換しない)を含む変異体が挙げられる。特に、タンパク質における「中性」アミノ酸置換は、一般的にそのタンパク質の活性にほとんど影響しない。

[0121] タンパク質のアミノ酸配列中のいくつかのアミノ酸が、このタンパク質の構造または機能に有意に影響することなく容易に改変され得ることは、当該分野において周知である。さらに、人為的に改変させるだけではなく、天然のタンパク質において、当該タンパク質の構造または機能を有意に変化させない変異体が存在することもまた周知である。

[0122] 当業者は、周知技術を使用してタンパク質のアミノ酸配列において1または数個のアミノ酸を容易に変異させることができる。例えば、公知の点変異導入法に従えば、タンパク質をコードするポリヌクレオチドの任意の塩基を変異させることができる。また、



タンパク質をコードするポリヌクレオチドの任意の部位に対応するプライマーを設計して欠失変異体または付加変異体を作製することができる。さらに、本明細書中に記載される方法を用いれば、作製した変異体が所望の活性を有するか否かを容易に決定し得る。

- [0123] 好ましい変異体は、保存性もしくは非保存性アミノ酸置換、欠失、または添加を有する。好ましくは、サイレント置換、添加、および欠失であり、特に好ましくは、保存性置換である。これらは、本発明に係るタンパク質活性を変化させない。
- [0124] 代表的に保存性置換と見られるのは、脂肪族アミノ酸Ala、Val、Leu、およびIleの中での1つのアミノ酸の別のアミノ酸への置換；ヒドロキシル残基SerおよびThrの交換、酸性残基AspおよびGluの交換、アミド残基AsnおよびGlnの間の置換、塩基性残基LysおよびArgの交換、ならびに芳香族残基Phe、Tyrの間の置換である。
- [0125] 上記に詳細に示されるように、どのアミノ酸の変化が表現型的にサイレントでありそうか(すなわち、機能に対して有意に有害な効果を有しそうにないか)に関するさらなるガイダンスは、Bowie, J. U. ら「Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions」, Science 247:1306-1310 (1990) (本明細書中に参考として援用される)に見出され得る。
- [0126] 本実施形態に係る転写因子は、以下の(a)または(b)記載のタンパク質であることが好ましい。
- (a) 配列番号140に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号140に示されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。
- [0127] なお、上記の「(i) 記載のアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列」及び「配列番号140に示されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列」における「1個または数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。このような変異タンパク質は、上述したように、公知の変異タンパク質作製法により人為的に導入された変異を有

するタンパク質に限定されるものではなく、天然に存在するタンパク質を単離精製したものであってもよい。

[0128] なお、本発明に係るタンパク質は、アミノ酸がペプチド結合しているタンパク質であればよいが、これに限定されるものではなく、タンパク質以外の構造を含む複合タンパク質であってもよい。本明細書中で使用される場合、「タンパク質以外の構造」としては、糖鎖やイソプレノイド基等を挙げることができるが、特に限定されるものではない。

[0129] また、本発明に係るタンパク質は、付加的なタンパク質を含むものであってもよい。付加的なタンパク質としては、例えば、HisやMyc、Flag等のエピトープ標識タンパク質が挙げられる。

[0130] ところで、花のホメオティック遺伝子は、シロイヌナズナやキンギョソウなどから単離されており、双子葉植物のみならず単子葉植物でも同様に機能すると考えられている。そのため、AG遺伝子がコードする転写因子等の、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられる。したがって、八重咲き植物体の形成を行う個々の植物体において、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子やその遺伝子を必ずしも単離する必要はない。すなわち、後述する実施例で示す、シロイヌナズナで構築したキメラタンパク質を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において八重咲き植物体を生産することができる。

[0131] 本発明で用いられるキメラタンパク質を生産する際には、後述するように、公知の遺伝子組換え技術を好適に用いることができる。そこで、本発明にかかる植物体の生産方法には、上記転写因子をコードする遺伝子(ポリヌクレオチド)も好適に用いることができる。

[0132] 上記転写因子をコードする遺伝子は、RNA(例えば、mRNA)の形態、またはDNAの形態(例えば、cDNAまたはゲノムDNA)で存在し得る。DNAは、二本鎖であっても一本鎖であってもよい。一本鎖DNAまたはRNAは、コード鎖(センス鎖としても知られる)であっても、非コード鎖(アンチセンス鎖としても知られる)であってもよい。

[0133] 上記転写因子をコードする遺伝子はさらに、雄しべおよび雌しべの形成に関与する

転写因子をコードする遺伝子の変異体であってもよい。変異体は、天然の対立遺伝子変異体のように、天然に生じ得る。「対立遺伝子変異体」によって、生物の染色体上の所定の遺伝子座を占める遺伝子のいくつかの交換可能な形態の1つが意図される。天然に存在しない変異体は、例えば当該分野で周知の変異誘発技術を用いて生成され得る。

[0134] このような変異体としては、上記転写因子をコードするポリヌクレオチドの塩基配列において1または数個の塩基が欠失、置換、または付加した変異体が挙げられる。変異体は、コードもしくは非コード領域、またはその両方において変異され得る。コード領域における変異は、保存的もしくは非保存的なアミノ酸欠失、置換、または付加を生成し得る。

[0135] 上記転写因子をコードする遺伝子は、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下で、上記転写因子をコードする遺伝子または当該遺伝子にハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む。

[0136] 一実施形態において、上記転写因子をコードする遺伝子は、以下の(c)または(d)記載のポリヌクレオチドであることが好ましい。

(c) 配列番号141に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

(d) 配列番号141に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、雄しべおよび雌しべの形成に関与するタンパク質をコードする遺伝子。

[0137] なお、上記「ストリンジェントな条件」とは、少なくとも90%以上の同一性、好ましくは少なくとも95%以上の同一性、最も好ましくは97%の同一性が配列間に存在する時にのみハイブリダイゼーションが起こることを意味する。

[0138] 上記ハイブリダイゼーションは、上述のように従来公知の方法で行うことができる。通常、温度が高いほど、塩濃度が低いほどストリンジェンシーは高くなり(ハイブリダイズし難くなる)、より相同なポリヌクレオチドを取得することができる。ハイブリダイゼーションの条件としては、従来公知の条件を好適に用いることができ、特に限定しないが、例えば、42℃、6×SSPE、50%ホルムアミド、1%SDS、100 μg/ml サケ精

子DNA、5×デンハルト液(ただし、1×SSPE;0.18M 塩化ナトリウム、10mMリン酸ナトリウム、pH7.7、1mM EDTA。5×デンハルト液;0.1% 牛血清アルブミン、0.1% フィコール、0.1% ポリビニルピロリドン)が挙げられる。

[0139] 上記転写因子をコードする遺伝子を取得する方法は特に限定されるものではなく、公知の技術により、上記転写因子をコードするポリヌクレオチドを含むDNA断片を単離し、クローニングする方法を用いることができる。例えば、上記転写因子をコードする遺伝子の塩基配列の一部と特異的にハイブリダイズするプローブを調製し、ゲノムDNAライブラリーやcDNAライブラリーをスクリーニングすればよい。このようなプローブとしては、上記転写因子をコードする遺伝子の塩基配列またはその相補配列の少なくとも一部に特異的にハイブリダイズするプローブであれば、いずれの配列および/または長さのものを用いてもよい。

[0140] あるいは、上記転写因子をコードする遺伝子を取得する方法として、PCR等の増幅手段を用いる方法を挙げることができる。例えば、上記転写因子をコードするポリヌクレオチドのcDNAのうち、5'側および3'側の配列(またはその相補配列)の中からそれぞれプライマーを調製し、これらプライマーを用いてゲノムDNA(またはcDNA)等を鋳型にしてPCR等を行い、両プライマー間に挟まれるDNA領域を増幅することで、上記転写因子をコードするポリヌクレオチドを含むDNA断片を大量に取得できる。

[0141] (I-2)任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチド

本発明で用いられる、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチド(説明の便宜上、転写抑制転換ペプチドと称する)としては、特に限定されるものではなく、転写因子と融合させたキメラタンパク質を形成させることにより、当該転写因子により制御される標的遺伝子の転写を抑制することができるペプチドであればよい。具体的には、例えば、本発明者によって見出された転写抑制転換ペプチド(特許文献3〜9、非特許文献10・11等参照)を挙げることができる。

[0142] 本発明者は、Class II ERF遺伝子群の一つであるシロイヌナズナ由来のAtERF3タンパク質、AtERF4タンパク質、AtERF7タンパク質、AtERF8タンパク質を転写因子に結合させたタンパク質が、遺伝子の転写を顕著に抑制するとの知見を得た。そこで、上記タンパク質をそれぞれコードする遺伝子およびこれから切り出したDNA

を含むエフェクタープラスミドを構築し、これを植物細胞に導入することにより、実際に遺伝子の転写を抑制することに成功した(例えば特許文献3〜6参照)。また、Class II ERF遺伝子群の一つであるタバコERF3タンパク質(例えば特許文献7参照)、イネOsERF3タンパク質(例えば特許文献8参照)をコードする遺伝子、及び、ジンクフィンガータンパク質の遺伝子群の一つであるシロイヌナズナZAT10、同ZAT11をコードする遺伝子についても上記と同様な試験を行ったところ、遺伝子の転写を抑制することを見出している。さらに本発明者は、これらタンパク質は、カルボキシル基末端領域に、アスパラギン酸-ロイシン-アスパラギン(DLN)を含む共通のモチーフを有することを明らかにした。そして、この共通モチーフを有するタンパク質について検討した結果、遺伝子の転写を抑制するタンパク質は極めて単純な構造のペプチドであつてもよく、これら単純な構造を有するペプチドが、任意の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有することを見出している。

[0143] また、本発明者は、シロイヌナズナSUPERMANタンパク質は、上記の共通のモチーフと一致しないモチーフを有するが、任意の転写因子を転写抑制因子に変換する機能を有すること、また該SUPERMANタンパク質をコードする遺伝子を、転写因子のDNA結合ドメイン又は転写因子をコードする遺伝子に結合させたキメラ遺伝子は、強力な転写抑制能を有するタンパク質を産生することも見出している。

[0144] したがって、本発明において用いられる転写抑制転換ペプチドの一例として、本実施の形態では、Class II ERFタンパク質であるシロイヌナズナ由来のAtERF3タンパク質、同AtERF4タンパク質、同AtERF7タンパク質、同AtERF8タンパク質、タバコERF3タンパク質、イネOsERF3タンパク質、ジンクフィンガータンパク質の一つであるシロイヌナズナZAT10タンパク質、同ZAT11タンパク質等のタンパク質、同SUPERMANタンパク質、これらから切り出したペプチドや、上記機能を有する合成ペプチド等を挙げることができる。

[0145] 上記転写抑制転換ペプチドの一例の具体的な構造は、下記式(1)〜(4)の何れかで表されるアミノ酸配列となっている。

(1) X1-Leu-Asp-Leu-X2-Leu-X3

(但し、式中、X1は0〜10個のアミノ酸残基を示し、X2はAsn又はGluを示し、X3は

少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(2) Y1-Phe-Asp-Leu-Asn-Y2-Y3

(但し、式中、Y1は0〜10個のアミノ酸残基を示し、Y2はPheまたはIleを示し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(3) Z1-Asp-Leu-Z2-Leu-Arg-Leu-Z3

(但し、式中、Z1はLeu、Asp-LeuまたはLeu-Asp-Leuを示し、Z2はGlu、GlnまたはAspを示し、Z3は0〜10個のアミノ酸残基を示す。)

(4) Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leu

(但し、式中、Z4はGlu、GlnまたはAspを示す。)

[0146] (I-2-1)式(1)の転写抑制転換ペプチド

上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記X1で表されるアミノ酸残基の数は0〜10個の範囲内であればよい。また、X1で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、N末端側には、1個の任意のアミノ酸または2〜10個の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていてもよいし、アミノ酸が何も付加されていなくてもよい。

[0147] このX1で表されるアミノ酸残基は、式(1)の転写抑制転換ペプチドを合成するときの容易さからみれば、できるだけ短いほうがよい。具体的には、10個以下であることが好ましく、5個以下であることがより好ましい。

[0148] 同様に、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記X3で表されるアミノ酸残基の数は少なくとも6個であればよい。また、X3で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいては、C末端側には、6個以上の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていけばよい。上記X3で表されるアミノ酸残基は、最低6個あれば上記機能を示すことができる。

[0149] 上記式(1)の転写抑制転換ペプチドにおいて、X1およびX3を除いた5個のアミノ酸残基からなるペプタマー(5mer)の具体的な配列は、配列番号41、42に示す。なお、上記X2がAsnの場合のアミノ酸配列が配列番号41に示すアミノ酸配列であり、

上記X2がGluの場合のアミノ酸配列が配列番号42に示すアミノ酸配列である。

[0150] (I-2-2)式(2)の転写抑制転換ペプチド

上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドのX1と同様、上記Y1で表されるアミノ酸残基の数は0〜10個の範囲内であればよい。また、Y1で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドと同様、N末端側には、1個の任意のアミノ酸または2〜10個の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていてもよいし、アミノ酸が何も付加されていなくてもよい。

[0151] このY1で表されるアミノ酸残基は、式(2)の転写抑制転換ペプチドを合成するときの容易さからみれば、できるだけ短いほうがよい。具体的には、10個以下であることが好ましく、5個以下であることがより好ましい。

[0152] 同様に、上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドのX3と同様、上記Y3で表されるアミノ酸残基の数は少なくとも6個であればよい。また、Y3で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドと同様、C末端側には、6個以上の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていればよい。上記Y3で表されるアミノ酸残基は、最低6個あれば上記機能を示すことができる。

[0153] 上記式(2)の転写抑制転換ペプチドにおいて、Y1およびY3を除いた5個のアミノ酸残基からなるペプタマー(5mer)の具体的な配列は、配列番号43、44に示す。なお、上記Y2がPheの場合のアミノ酸配列が配列番号43に示すアミノ酸配列であり、上記Y2がIleの場合のアミノ酸配列が配列番号44に示すアミノ酸配列である。また、Y2を除いた4個のアミノ酸残基からなるテトラマー(4mer)の具体的な配列は、配列番号45に示す。

[0154] (I-2-3)式(3)の転写抑制転換ペプチド

上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記Z1で表されるアミノ酸残基

は、1〜3個の範囲内でLeuを含むものとなっている。アミノ酸1個の場合は、Leuであり、アミノ酸2個の場合は、Asp-Leuとなっており、アミノ酸3個の場合はLeu-Asp-Leuとなっている。

[0155] 一方、上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいては、上記式(1)の転写抑制転換ペプチドのX1等と同様、上記Z3で表されるアミノ酸残基の数は0〜10個の範囲内であればよい。また、Z3で表されるアミノ酸残基を構成する具体的なアミノ酸の種類は特に限定されるものではなく、どのようなものであってもよい。換言すれば、上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいては、C末端側には、1個の任意のアミノ酸または2〜10個の任意のアミノ酸残基からなるオリゴマーが付加されていてもよいし、アミノ酸が何も付加されていなくてもよい。

[0156] このZ3で表されるアミノ酸残基は、式(3)の転写抑制転換ペプチドを合成するときに容易さからみれば、できるだけ短いほうがよい。具体的には、10個以下であることが好ましく、5個以下であることがより好ましい。Z3で表されるアミノ酸残基の具体的な例としては、Gly、Gly-Phe-Phe、Gly-Phe-Ala、Gly-Tyr-Tyr、Ala-Ala-Ala等が挙げられるが、もちろんこれらに限定されるものではない。

[0157] また、この式(3)で表される転写抑制転換ペプチド全体のアミノ酸残基の数は、特に限定されるものではないが、合成するときの容易さからみれば、20アミノ酸以下であることが好ましい。

[0158] 上記式(3)の転写抑制転換ペプチドにおいて、Z3を除いた7〜10個のアミノ酸残基からなるオリゴマーの具体的な配列は、配列番号46〜54に示す。なお、上記Z1がLeuかつZ2がGlu、GlnまたはAspの場合のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号46、47または48に示すアミノ酸配列であり、上記Z1がAsp-LeuかつZ2がGlu、GlnまたはAspの場合のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号49、50または51に示すアミノ酸配列であり、上記Z1がLeu-Asp-LeuかつZ2がGlu、GlnまたはAspの場合のアミノ酸配列が、それぞれ配列番号52、53または54に示すアミノ酸配列である。

[0159] (I-2-4) 式(4)の転写抑制転換ペプチド

上記式(4)の転写抑制転換ペプチドは、6個のアミノ酸残基からなるヘキサマー(6mer)であり、その具体的な配列は、配列番号5、14、55に示す。なお、上記Z4がGl



uの場合のアミノ酸配列が配列番号5に示すアミノ酸配列であり、上記Z4がAspの場合のアミノ酸配列が配列番号14に示すアミノ酸配列であり、上記Z4がGlnの場合のアミノ酸配列が配列番号55に示すアミノ酸配列である。

[0160] 特に、本発明において用いられる転写抑制転換ペプチドは、上記式(4)で表されるヘキサマーのような最小配列を有するペプチドであってもよい。例えば、配列番号5に示すアミノ酸配列は、シロイヌナズナSUPERMANタンパク質(SUPタンパク質)の196〜201番目のアミノ酸配列に相当し、上述したように、本発明者が新たに上記転写抑制転換ペプチドとして見出したものである。

[0161] (I-2-5) 転写抑制転換ペプチドのより具体的な例

上述した各式で表される転写抑制転換ペプチドのより具体的な例としては、例えば、配列番号1〜17のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。これらオリゴペプチドは、本発明者が上記転写抑制転換ペプチドであることを見出したものである(例えば、特許文献9参照)。

[0162] さらに、上記転写抑制転換ペプチドの他の具体的な例として、次に示す(e)又は(f)記載のオリゴペプチドを挙げることができる。

(e) 配列番号18又は19に示されるいずれかのアミノ酸配列からなるペプチド。

(f) 配列番号18又は19に示されるいずれかのアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなるペプチド。

[0163] 上記配列番号18に示されるアミノ酸配列からなるペプチドは、SUPタンパク質である。また、上記の「配列番号18又は19に示されるいずれかのアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列」における「1個又は数個」の範囲は特に限定されないが、例えば、1から20個、好ましくは1から10個、より好ましくは1から7個、さらに好ましくは1個から5個、特に好ましくは1個から3個を意味する。

[0164] 上記アミノ酸の欠失、置換若しくは付加は、上記ペプチドをコードする塩基配列を、当該技術分野で公知の手法によって改変することによって行うことができる。塩基配列に変異を導入するには、Kunkel法またはGapped duplex法等の公知手法又はこれ

に準ずる方法により行うことができ、例えば部位特異的突然変異誘発法を利用した変異導入用キット(例えばMutant-KやMutant-G(何れも商品名、TAKARA社製))等を用いて、あるいはLA PCR in vitro Mutagenesisシリーズキット(商品名、TAKARA社製)を用いて異変が導入される。

[0165] また、上記機能性ペプチドは、配列番号18に示されるアミノ酸配列の全長配列を有するペプチドに限られず、その部分配列を有するペプチドであってもよい。

[0166] その部分配列を有するペプチドとしては、例えば、配列番号19に示されるアミノ酸配列(SUPタンパク質の175から204番目のアミノ酸配列)を有するペプチドが挙げられ、その部分配列を有するペプチドとしては、上記(3)で表されるペプチドが挙げられる。

[0167] (I-3) 転写抑制転換ペプチドの他の例

本発明者は、さらに、上記モチーフの構造について検討した結果、新たに6つのアミノ酸からなるモチーフを見出した。このモチーフは、具体的には、次に示す一般式(5)で表されるアミノ酸配列を有するペプチドである。これらのペプチドも、上記転写抑制転換ペプチドに含まれる。

(5)  $\alpha 1$ -Leu- $\beta 1$ -Leu- $\gamma 1$ -Leu

但し、上記式(5)中 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser又はHisを示し、 $\gamma 1$ は、Arg、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys又はAspを示す。

[0168] なお、上記一般式(5)で表されるペプチドを、便宜上、次に示す一般式(6)、(7)、(8)又は(9)で表されるアミノ酸配列を有しているペプチドに分類する。

(6)  $\alpha 1$ -Leu- $\beta 1$ -Leu- $\gamma 2$ -Leu

(7)  $\alpha 1$ -Leu- $\beta 2$ -Leu-Arg-Leu

(8)  $\alpha 2$ -Leu- $\beta 1$ -Leu-Arg-Leu

(9) Asp-Leu- $\beta 3$ -Leu-Arg-Leu

ただし、上記各式中、 $\alpha 1$ は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\alpha 2$ は、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示す。また、 $\beta 1$ は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser又はHisを示し、 $\beta 2$ はAsn、Arg、Thr、Ser又はHisを示し、 $\beta 3$ は、Glu、A

sp又はGlnを示す。さらに、 $\gamma$  2は、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys又はAspを示す。

[0169] 上記式(5)～(9)で表されるアミノ酸配列を有する転写抑制転換ペプチドのより具体的な例としては、配列番号20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、38、39、40または152で表されるアミノ酸配列を有するペプチドを挙げることができる。このうち、配列番号27、28、30、32、38、39、40または152のペプチドは、一般式(6)に示されるペプチドに相当し、配列番号20、23、33、34または35のペプチドは、一般式(7)に示されるペプチドに相当し、配列番号24、25、26、29、または31のペプチドは、一般式(8)に示されるペプチドに相当し、配列番号21または22のペプチドは、一般式(9)に示されるペプチドに相当する。

[0170] また、上記一般式(5)～(9)に示されるペプチド以外にも配列番号36または37で表されるアミノ酸配列を有する転写抑制転換ペプチドを用いることもできる。

[0171] (I-4)キメラタンパク質の生産方法

上記(I-2)および(I-3)で説明した各種転写抑制転換ペプチドは、上記(I-1)で説明した転写因子と融合してキメラタンパク質とすることにより、当該転写因子を転写抑制因子とすることができる。したがって、本発明では、上記転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを用いて、転写因子をコードするポリヌクレオチドとのキメラ遺伝子を得れば、キメラタンパク質を生産させることができる。

[0172] 具体的には、上記転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチド(説明の便宜上、転写抑制転換ポリヌクレオチドと称する)と上記転写因子をコードするポリヌクレオチドとを連結することによりキメラ遺伝子を構築して、植物細胞に導入する。これによりキメラタンパク質を生産させることができる。なお、キメラ遺伝子を植物細胞に導入する具体的な方法については、後述する(II)の項で詳細に説明する。

[0173] 上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの具体的な塩基配列は特に限定されるものではなく、遺伝暗号に基づいて、上記転写抑制転換ペプチドのアミノ酸配列に対応する塩基配列を含んでいけばよい。また、必要に応じて、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドは、転写因子をコードするポリヌクレオチドと連結するための連結部位となる塩基配列を含んでいてもよい。さらに、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドのアミノ酸読

み枠と転写因子をコードするポリヌクレオチドの読み枠とが一致しないような場合に、これらを一致させるための付加的な塩基配列を含んでもよい。

上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの具体例としては、例えば、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、116、118、120、122、124、126、128、130、132、または153に示される塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。また、配列番号57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、115、117、119、121、123、125、127、129、131、133または154に示されるポリヌクレオチドは、それぞれ、上記例示されたポリヌクレオチドと相補的なポリヌクレオチドである。また、上記転写抑制転換ポリヌクレオチドの他の具体例としては、例えば、配列番号90、91に示されるポリヌクレオチドを挙げることができる。これらのポリヌクレオチドは、以下の表1に示すように配列番号1〜40、152に示されるアミノ酸配列に対応するものである。

[0174] [表1]

アミノ酸配列	塩基配列	アミノ酸配列	塩基配列
配列番号 1	配列番号 5 6 ・ 5 7	配列番号 2 2	配列番号 9 6 ・ 9 7
配列番号 2	配列番号 5 8 ・ 5 9	配列番号 2 3	配列番号 9 8 ・ 9 9
配列番号 3	配列番号 6 0 ・ 6 1	配列番号 2 4	配列番号 1 0 0 ・ 1 0 1
配列番号 4	配列番号 6 2 ・ 6 3	配列番号 2 5	配列番号 1 0 2 ・ 1 0 3
配列番号 5	配列番号 6 4 ・ 6 5	配列番号 2 6	配列番号 1 0 4 ・ 1 0 5
配列番号 6	配列番号 6 6 ・ 6 7	配列番号 2 7	配列番号 1 0 6 ・ 1 0 7
配列番号 7	配列番号 6 8 ・ 6 9	配列番号 2 8	配列番号 1 0 8 ・ 1 0 9
配列番号 8	配列番号 7 0 ・ 7 1	配列番号 2 9	配列番号 1 1 0 ・ 1 1 1
配列番号 9	配列番号 7 2 ・ 7 3	配列番号 3 0	配列番号 1 1 2 ・ 1 1 3
配列番号 1 0	配列番号 7 4 ・ 7 5	配列番号 3 1	配列番号 1 1 4 ・ 1 1 5
配列番号 1 1	配列番号 7 6 ・ 7 7	配列番号 3 2	配列番号 1 1 6 ・ 1 1 7
配列番号 1 2	配列番号 7 8 ・ 7 9	配列番号 3 3	配列番号 1 1 8 ・ 1 1 9
配列番号 1 3	配列番号 8 0 ・ 8 1	配列番号 3 4	配列番号 1 2 0 ・ 1 2 1
配列番号 1 4	配列番号 8 2 ・ 8 3	配列番号 3 5	配列番号 1 2 2 ・ 1 2 3
配列番号 1 5	配列番号 8 4 ・ 8 5	配列番号 3 6	配列番号 1 2 4 ・ 1 2 5
配列番号 1 6	配列番号 8 6 ・ 8 7	配列番号 3 7	配列番号 1 2 6 ・ 1 2 7
配列番号 1 7	配列番号 8 8 ・ 8 9	配列番号 3 8	配列番号 1 2 8 ・ 1 2 9
配列番号 1 8	配列番号 9 0	配列番号 3 9	配列番号 1 3 0 ・ 1 3 1
配列番号 1 9	配列番号 9 1	配列番号 4 0	配列番号 1 3 2 ・ 1 3 3
配列番号 2 0	配列番号 9 2 ・ 9 3	配列番号 1 5 2	配列番号 1 5 3 ・ 1 5 4
配列番号 2 1	配列番号 9 4 ・ 9 5		

[0175] 本発明で用いられるキメラタンパク質は、転写因子をコードする遺伝子と転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結した上記キメラ遺伝子から得ることができる。したがって、上記キメラタンパク質には、上記転写因子の部位と、上記転写抑制転換ペプチドの部位とが含まれていればよく、その構成は特に限定されるものではない。例えば、転写因子と転写抑制転換ペプチドとの間をつなぐためのリンカー機能を有するポリペプチドや、HisやMyc、Flag等のようにキメラタンパク質をエピトープ標識するためのポリペプチド等、各種の付加的なポリペプチドが含まれていてもよい。さらに上記キメラタンパク質には、必要に応じて、ポリペプチド以外の構造、例えば、糖鎖やイソプレノイド基等が含まれていてもよい。

[0176] (II) 本発明にかかる植物体の生産方法の一例

本発明にかかる植物体の生産方法は、上記(I)で説明したキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に關与する遺伝子の発現を抑制する過程、蒴の裂開を抑制する過程、または八重咲き植物体を生産する過程を含んでいれば特に限定されるものではないが、本発明にかかる植物体の生産方法を具体的な工程で示せば、例えば、発現ベクター構築工程、形質転換工程、選抜工程等の工程を含む生産方法として挙げることができる。このうち、本発明では、少なくとも形質転換工程が含まれていればよい。以下、各工程について具体的に説明する。

[0177] (II-1)発現ベクター構築工程

本発明において行われる発現ベクター構築工程は、上記(I-1)で説明した転写因子をコードする遺伝子と、上記(I-4)で説明した転写抑制転換ポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを構築する工程であれば特に限定されるものではない。

[0178] 上記組換え発現ベクターの母体となるベクターとしては、従来公知の種々のベクターを用いることができる。例えば、プラスミド、ファージ、またはコスミド等を用いることができ、導入される植物細胞や導入方法に応じて適宜選択することができる。具体的には、例えば、pBR322、pBR325、pUC19、pUC119、pBluescript、pBluescriptS K、pBI系のベクター等を挙げることができる。特に、植物体へのベクターの導入法がアグロバクテリウムを用いる方法である場合には、pBI系のバイナリーベクターを用いることが好ましい。pBI系のバイナリーベクターとしては、具体的には、例えば、pBIG、pBIN19、pBI101、pBI121、pBI221等を挙げることができる。

[0179] 上記プロモーターは、植物体内で遺伝子を発現させることが可能なプロモーターであれば特に限定されるものではなく、公知のプロモーターを好適に用いることができる。かかるプロモーターとしては、例えば、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(CaMV35S)、アクチンプロモーター、ノパリン合成酵素のプロモーター、タバコのPR1a遺伝子プロモーター、トマトのリプロース1、5-ニリン酸カルボキシラーゼ・オキシダーゼ小サブユニットプロモーター等を挙げることができる。この中でも、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターまたはアクチンプロモーターをより好ましく用いることができる。これらのプロモーターを用いれば、得られる組換え発現ベクターで

は、植物細胞内に導入されたときに任意の遺伝子を強く発現させることが可能となる。また、上記プロモーターは、薬特異的に遺伝子を発現させることができるプロモーターであることがさらに好ましい。かかるプロモーターとしては、例えばTA56プロモーター、AtMYB26プロモーター、DAD1プロモーター等を挙げることができる。このようなプロモーターを用いることにより、上記キメラタンパク質をコードする遺伝子を薬でのみ発現させて、他の組織に影響を与えることなく、薬の裂開を抑制することが可能となる。また、上記プロモーターは、NACAD1や種々の植物に保存されている同様の転写因子をコードする遺伝子のプロモーターであることが特に好ましい。かかるプロモーターを用いることにより、当該遺伝子の発現の時期及び組織に特異的に遺伝子を発現させることが可能となり、薬の裂開をより効果的に抑制することができる。

[0180] 上記プロモーターは、転写因子をコードする遺伝子と転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結したキメラ遺伝子を発現しうるように連結され、ベクター内に導入されていればよく、組換え発現ベクターとしての具体的な構造は特に限定されるものではない。

[0181] 上記組換え発現ベクターは、上記プロモーターおよび上記キメラ遺伝子に加えて、さらに他のDNAセグメントを含んでいてもよい。当該他のDNAセグメントは特に限定されるものではないが、ターミネーター、選別マーカー、エンハンサー、翻訳効率を高めるための塩基配列等を挙げることができる。また、上記組換え発現ベクターは、さらにT-DNA領域を有していてもよい。T-DNA領域は特にアグロバクテリウムを用いて上記組換え発現ベクターを植物体に導入する場合に遺伝子導入の効率を高めることができる。

[0182] ターミネーターは転写終結部位としての機能を有していれば特に限定されるものではなく、公知のものであってもよい。例えば、具体的には、ノパリン合成酵素遺伝子の転写終結領域(Nosターミネーター)、カリフラワーモザイクウイルス35Sの転写終結領域(CaMV35Sターミネーター)等を好ましく用いることができる。この中でもNosターミネーターをより好ましく用いることができる。

[0183] 上記形質転換ベクターにおいては、ターミネーターを適当な位置に配置することにより、植物細胞に導入された後に、不必要に長い転写物を合成したり、強力なプロモ

ーターがプラスミドのコピー数の減少させたりするような現象の発生を防止することができる。

- [0184] 上記選別マーカーとしては、例えば薬剤耐性遺伝子を用いることができる。かかる薬剤耐性遺伝子の具体的な一例としては、例えば、ハイグロマイシン、ブレオマイシン、カナマイシン、ゲンタマイシン、クロラムフェニコール等に対する薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。これにより、上記抗生物質を含む培地中で生育する植物体を選択することによって、形質転換された植物体を容易に選別することができる。
- [0185] 上記翻訳効率を高めるための塩基配列としては、例えばタバコモザイクウイルス由来のomega配列を挙げることができる。このomega配列をプロモーターの非翻訳領域(5' UTR)に配置させることによって、上記キメラ遺伝子の翻訳効率を高めることができる。このように、上記形質転換ベクターには、その目的に応じて、さまざまなDNAセグメントを含ませることができる。
- [0186] 上記組換え発現ベクターの構築方法についても特に限定されるものではなく、適宜選択された母体となるベクターに、上記プロモーター、転写因子をコードする遺伝子、および転写抑制転換ポリヌクレオチド、並びに必要なに応じて上記他のDNAセグメントを所定の順序となるように導入すればよい。例えば、転写因子をコードする遺伝子と転写抑制転換ポリヌクレオチドとを連結してキメラ遺伝子を構築し、次に、このキメラ遺伝子とプロモーターと(必要に応じてターミネーター等)とを連結して発現カセットを構築し、これをベクターに導入すればよい。
- [0187] キメラ遺伝子の構築および発現カセットの構築では、例えば、各DNAセグメントの切断部位を互いに相補的な突出末端としておき、ライゲーション酵素で反応させることで、当該DNAセグメントの順序を規定することが可能となる。なお、発現カセットにターミネーターが含まれる場合には、上流から、プロモーター、上記キメラ遺伝子、ターミネーターの順となっていればよい。また、組換え発現ベクターを構築するための試薬類、すなわち制限酵素やライゲーション酵素等の種類についても特に限定されるものではなく、市販のものを適宜選択して用いればよい。
- [0188] また、上記組換え発現ベクターの増殖方法(生産方法)も特に限定されるものではなく、従来公知の方法を用いることができる。一般的には大腸菌を宿主として当該大



腸菌内で増殖させればよい。このとき、ベクターの種類に応じて、好ましい大腸菌の種類を選択してもよい。

[0189] (II-2)形質転換工程

本発明において行われる形質転換工程は、上記(II-1)で説明した組換え発現ベクターを植物細胞に導入して、上記(I)で説明したキメラタンパク質を生産させるようになっていけばよい。

[0190] 上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入する方法(形質転換方法)は特に限定されるものではなく、植物細胞に応じた適切な従来公知の方法を用いることができる。具体的には、例えば、アグロバクテリウムを用いる方法や直接植物細胞に導入する方法を用いることができる。アグロバクテリウムを用いる方法としては、例えば、Transformation of Arabidopsis thaliana by vacuum infiltration(<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>)を用いることができる。

[0191] 組換え発現ベクターを直接植物細胞に導入する方法としては、例えば、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法(電気穿孔法)、ポリエチレングリコール法、パーティクルガン法、プロトプラスト融合法、リン酸カルシウム法等を用いることができる。

[0192] 上記組換え発現ベクターが導入される植物細胞としては、例えば、花、葉、根等の植物器官における各組織の細胞、カルス、懸濁培養細胞等を挙げることができる。

[0193] ここで、本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記組換え発現ベクターは、生産しようとする種類の植物体に合わせて適切なものを適宜構築してもよいが、汎用的な組換え発現ベクターを予め構築しておき、それを植物細胞に導入してもよい。すなわち、本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記(I-1)で説明した組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいし、含まれていなくてもよい。

[0194] (II-3)その他の工程、その他の方法

本発明にかかる植物体の生産方法においては、上記形質転換工程が含まれていればよく、さらに上記組換え発現ベクター構築工程が含まれていてもよいが、さらに他の工程が含まれていてもよい。具体的には、形質転換後の植物体から適切な形質転換体を選抜する選抜工程等を挙げることができる。

- [0195] 選抜の方法は特に限定されるものではなく、例えば、ハイグロマイシン耐性等の薬剤耐性を基準として選抜してもよいし、形質転換体を育成した後に、成長した植物体において、正常な花粉形成ができないことを基準として選抜してもよい。また、形質転換体を育成した後に、葯の裂開の状況から選抜してもよい。例えば、葯の裂開の状況から選抜する例としては、電子顕微鏡、実体顕微鏡等を用いて、葯の形状を観察する方法を挙げることができる(後述の実施例参照)。
- [0196] また、形質転換体を育成した後に、植物体そのものの花の形態から選抜してもよい。例えば、花の形態から選抜する例としては、形質転換体の花の形態を、形質転換していない植物体の花の形態と比較する方法を挙げることができる(後述の実施例参照)。特に花の形態は、単に比較するだけでも選抜が可能になるとともに、八重咲き植物体の生産という本発明の効果そのものも確認することができる。
- [0197] 本発明にかかる植物体の生産方法では、上記キメラ遺伝子を植物体に導入するため、該植物体から、有性生殖または無性生殖により花器形成に関与する遺伝子の発現が抑制された子孫を得ることが可能となる。また、葯の裂開が抑制された子孫を得ることが可能となる。さらに、花の形態が八重咲きとなる子孫を得ることが可能となる。また、該植物体やその子孫から植物細胞や、種子、果実、株、カルス、塊茎、切穂、塊等の繁殖材料を得て、これらを基に該植物体を量産することも可能となる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、選抜後の植物体を繁殖させる繁殖工程(量産工程)が含まれていてもよい。
- [0198] なお、本発明における植物体とは、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子の少なくとも何れかが含まれる。つまり、本発明では、最終的に植物個体まで成育させることができる状態のものであれば、全て植物体と見なす。また、上記植物細胞には、種々の形態の植物細胞が含まれる。かかる植物細胞としては、例えば、懸濁培養細胞、プロトプラスト、葉の切片等が含まれる。これらの植物細胞を増殖・分化させることにより植物体を得ることができる。なお、植物細胞からの植物体の再生は、植物細胞の種類に応じて、従来公知の方法を用いて行うことができる。したがって、本発明にかかる植物体の生産方法では、植物細胞から植物体を再生させる再生工程が含まれていてもよい。

[0199] また、本発明にかかる植物体の生産方法は、組換え発現ベクターで形質転換する方法に限定されるものではなく、他の方法を用いてもよい。具体的には、例えば、上記キメラタンパク質そのものを植物体に投与してもよい。この場合、最終的に利用する植物体の部位において花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制し、葯の裂開を抑制し、または花の形態を八重咲きにできるように、若年期の植物体にキメラタンパク質を投与すればよい。またキメラタンパク質の投与方法も特に限定されるものではなく、公知の各種方法を用いればよい。

[0200] (III)本発明により得られる植物体とその有用性、並びにその利用

本発明にかかる植物体の生産方法は、上記キメラタンパク質をコードする遺伝子を植物体で発現させることによる。当該キメラタンパク質における転写因子由来のDNA結合ドメインが、花器形成に関与すると推定される標的遺伝子に結合する。ここで、上記花器形成に関与すると推定される標的遺伝子は、雄しべまたは雌しべの形成に関与すると推定される標的遺伝子であってもよい。また、上述のように、上記雄しべまたは雌しべの形成に関与すると推定される標的遺伝子は、葯の裂開に関与すると推定される遺伝子であってもよい。さらに、雄しべおよび雌しべの形成に関与すると推定される遺伝子であってもよい。

[0201] 上記転写因子は転写抑制因子に転換され、標的遺伝子の転写が抑制される。これにより花器形成に変異が生じ、不稔性植物体を得ることができる。また、これにより葯の裂開を抑制することができる。さらに、これにより花の形態を八重咲きにすることができる。したがって、本発明には、上記植物体の生産方法により得られる植物体も含まれる。

[0202] 本発明において「不稔性植物体」には、雄しべおよび雌しべが形成されない完全不稔植物体の他、不和合性を持つ植物体、すなわち、雄しべおよび雌しべが形成されているが種子を形成できない植物体も含まれる。また、不完全な雄しべ様器官および／または雌しべ様器官を持つが、種子を形成できない植物体も含まれる。さらに、例えば、雄しべの形成が阻害され、花粉が全く形成されない不稔性植物体、雄しべは形成されるが、葯が形成されないために花粉が形成されない不稔性植物体、雄しべも葯も形成されるが、形成される花粉の量が少なく、葯の開裂に至らない不稔性植物

体、形成された花粉が肥大化して互いにくっついてしまい、全く飛散しない不稔性植物体などの、いわゆる雄性不稔植物体も含まれる。

[0203] 上記キメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子で目的の植物を形質転換すれば、複雑な遺伝子組み替え技術を利用することなく、非常に簡便に不稔性植物体を得ることができる。上記不稔性植物体は種子を形成することができない。また、完全不稔性植物体、雄性不稔植物体では、花粉の離散が生じない。したがって、遺伝子組み換え植物の環境への拡散を防止することができる。

[0204] また、上記雄性不稔植物体は、自家受粉することができないが、異なった品種間での交配は可能である。したがって、雑種強勢を利用した交配に好適に用いることができ、優れた形質を有する雑種第一代の育種を効率的に行うことができる。

[0205] また、雄性不稔は、確実に交雑種となるので、交配のために雄しべを除く必要がなく、多大な労力が軽減される。したがって、交配実験の効率化に適している。

[0206] (III-1)本発明にかかる植物体の具体例

ここで、本発明にかかる不稔性植物体の具体的な種類は特に限定されるものではなく、不稔性を獲得することによりその有用性が高まる植物、葯の裂開の抑制によりその有用性が高まる植物、または花の形態を八重咲きとすることによりその有用性が高まる植物を挙げることができる。かかる植物は、被子植物であってもよいし裸子植物であってもよい。裸子植物としては、例えば、スギ目のスギ科、マツ科、ヒノキ科の植物やマキ科の植物を挙げることができる。また、被子植物としては、単子葉植物であってもよいし、双子葉植物であってもよい。双子葉植物としては、例えば、シロイヌナズナ等のアブラナ科、ツバキ科等の植物を挙げることができる。

[0207] 双子葉植物としては、離弁花亜綱であってもよいし、合弁花亜綱であってもよい。合弁花亜綱としては、例えば、リンドウ目、ナス目、シソ目、アワゴケ目、オオバコ目、キキョウ目、ゴマノハグサ目、アカネ目、マツムシソウ目、キク目を挙げることができる。また、離弁花亜綱としては、例えば、ビワモドキ目、ツバキ目、アオイ目、サガリバナ目、ウツボカズラ目、スミレ目、ヤナギ目、フウチョウソウ目、ツツジ目、イワウメ目、カキノキ目、サクラソウ目等を挙げることができる。また、単子葉植物としては、イネ、トウモロコシ、ムギ等のイネ科、ホシクサ科等の植物を挙げることができる。

[0208] また、本発明にかかる不稔性植物体は、果実や種子を商品とする植物、花や植物体そのものを商品とする観葉植物(花卉植物)であってもよい。したがって、本発明にかかる不稔性植物体の具体例をさらに挙げると、ナタネ、ジャガイモ、ホウレンソウ、大豆、キャベツ、レタス、トマト、カリフラワー、さやいんげん、かぶ、大根、ブロッコリー、メロン、オレンジ、スイカ、ネギ、ゴボウなどの各種の食用植物、あるいはバラ、キク、あじさい、カーネーションなどの観葉植物がある。

[0209] (III-2)本発明の有用性

本発明は、不稔性植物体を生産することにより一定の効果がある分野に有用性がある。具体例を以下にいくつか挙げるが、本発明の有用性は、これらに限定されるものではない。

[0210] まず、本発明の技術により、正常な花粉形成ができない雄性不稔植物体を作出でき、雑種強勢を利用した交配による品種改良に利用できる。本発明の雄性不稔植物体では、正常な花粉形成ができないため、イネ等の自殖性植物であっても、自家受粉が行われない。そのため、他種の花粉を授粉することで、種間の交配を簡便に行える。これにより、雑種強勢を利用した、優良品種の一代雑種の探索を簡便かつ効率的に行うことができる。

[0211] また、本発明の技術により、葯の裂開が抑制された植物体を作出でき、雑種強勢を利用した交配による品種改良に利用できる。本発明の葯の裂開が抑制された植物体では、花粉が葯の外に放出されないため、イネ等の自殖性植物であっても、自家受粉が行われない。そのため、他種の花粉を授粉することで、種間の交配を簡便に行える。これにより、雑種強勢を利用した、優良品種の一代雑種の探索を簡便かつ効率的に行うことができる。

[0212] また、本発明の技術は、トウモロコシ等の他殖性植物にも適用できる。他殖性植物では、現在、人力で雄しべを刈り取る作業(除雄作業)により自家受粉を回避し、他品種の花粉を授粉して品種改良を行っている。これに対し、本発明の技術で雄性不稔植物体または葯の裂開が抑制された植物体を生産すれば、このような労力を必要としなくなるため、品種改良に必要な時間やコスト、あるいは優良品種の栽培に必要な手間を、現状に比較して大幅に低減することができる。

- [0213] 特に、本発明の技術により、花粉は稔性を有するが、葯の裂開が抑制された植物体を作出できるため、花粉自体には生殖能を残しつつ、自家受粉が起きない植物体を生産することが可能となり、育種等に有用である。すなわち、花粉自体には生殖能を残すことにより、ホモ接合性の個体を作出、維持することが可能となる。このような純系植物を自家交配することによって、均一な種子繁殖集団を得ることが可能となり、選抜作業を行なう手間や時間を低減することができる。
- [0214] また、本発明の技術は、タマネギやジャガイモなど、地下茎を商品とする植物にも応用できる。この種の植物では、受粉が起こると、地下茎の成長が著しく阻害され、商品価値が下がることが知られている。そのため、現在、受粉を回避するために除雄作業が必要となり、そのための手間やコストが非常に大きい。本発明の技術により、地下茎を商品とする植物の雄性不稔体または葯の裂開が抑制された植物体を得られるため、除雄作業を必要とせず、受粉を回避できる。そのため、植物体を育成して商品を生産する際のコストや時間を、現状に比較して大幅に低減できる。
- [0215] 本発明の技術は、果実や花を商品としない植物体にも好適に応用できる。その一例を挙げると、花粉症の予防がある。すなわち、花粉症の原因となる花粉を大量に撒き散らす植物、例えば、スギ、ヒノキ、サワラなどの樹木、カモガヤ、オオアワガエリ、ナガハグサなどのイネ科植物、ブタクサ、ヨモギ、カナムグラなどの雑草類において、本発明の技術により雄性不稔体を生産すれば、正常な花粉形成ができないため、これらの植物体から花粉が飛散する恐れがない。また、本発明の技術により葯の裂開が抑制された植物体を生産すれば、これらの植物体から花粉が飛散する恐れがない。そのため、これらのこれらの雄性不稔体または葯の裂開が抑制された植物体を、自然界の野生型植物体と置き換えてやれば、花粉症の原因となる花粉の飛散が抑えられるため、花粉症を予防できる。
- [0216] また、本発明の技術により、花粉を経由するウイルスの感染が原因となる、植物の病気を予防できる。ある種の植物ウイルスは、病的植物の花粉内に存在し、雄しべを通じて健全植物に伝染して病気を引き起こすことが知られている。本発明の技術により、正常な花粉形成ができない植物体を生産すれば、花粉を媒介するウイルス感染が行われなため、かかる植物の病気を予防できる。

- [0217] 本発明の技術により、遺伝子改変植物体の自然界への望ましくない拡散を防止できる。一例を挙げると、パルプの原料であるユーカリでは、遺伝子操作により、耐塩性や耐寒性に優れ、樹木が巨大化するなどの、より優れた形質を導入された遺伝子改変植物体が創出され、野外環境下における導入形質の検証実験が行われている。しかし、このような遺伝子改変植物体を野外環境下で育てると、風や昆虫等を媒体とした花粉の拡散を通じて、遺伝子改変植物体が自然界へ広く拡散していき、自然環境が改変される恐れがある。そのため、かかる問題に対処するために、遺伝子改変植物の検証実験を、外界から完全に隔離された、特殊な環境下で行う必要がある。
- [0218] しかし、本発明の技術を用いて、遺伝子改変植物体を、正常な花粉形成ができない雄性不稔体または蒴の裂開が抑制された植物体に形質転換させておけば、花粉の撒布による遺伝子改変植物体の自然界への拡散は起こらない。そのため、現状に比較して、実際の野外環境下により近い条件で、遺伝子改変植物体の検証試験を行うことができる。これにより、遺伝子改変植物体に導入した形質を、より自然な環境下で検証できる。
- [0219] また、本発明の技術を用いれば、がくや雄しべなど、花器の一部が欠損したり、あるいは変形したりした植物体を生産することができる。これにより、従来には存在しなかった特異な形状の花器を有する植物体を生産できるため、これまでにない、新たな観賞植物を得ることができる。
- [0220] また、本発明によれば、八重咲き植物体を生産することができるが、本発明の有用性は特に限定されるものではなく、八重咲き植物体の生産により効果がある分野であればよい。かかる分野としては、新規な園芸品種の創出への応用等を挙げることができる。
- [0221] まず、新規な園芸品種の創出への応用例について説明すると、本発明に係る植物体の生産方法を用いることにより、上記機能性ペプチドが付加されたカセットベクターに転写因子の遺伝子を組み込み、植物細胞に導入するだけで、上記キメラタンパク質を植物細胞内で発現させることができ、転写因子の標的遺伝子の転写を容易に抑制することができる。また、上述のように、上記転写因子の標的遺伝子の転写を抑制するという形質は、ドミナントであるため、上記キメラタンパク質の方が上記転写因子よ

りも優勢的に働いて、標的遺伝子の転写を抑制する。したがって、短期間に簡便、確実に八重咲き植物体を作出することができ、園芸上非常に有用である。

[0222] また、本発明により生産された八重咲き植物体または不稔性植物体では、種子の形成が行われず、さらに、完全不稔性植物体、雄性不稔植物体では花粉の離散が起こらないので、遺伝子組み換え植物の環境への拡散を防ぐことができ、非常に安全である。

[0223] さらに、本発明により生産された八重咲き植物体または不稔性植物体は、雑種強勢を利用した交配に好適に用いることができ、優れた形質を有する雑種第一代の育種を効率的に行うことができるため、農業上非常に有用である。

[0224] (III-3) 本発明の利用の一例

本発明の利用分野、利用方法は特に限定されるものではないが、一例として、本発明にかかる植物体の生産方法を行うためのキット、すなわち不稔性植物体生産キットを挙げることができる。

[0225] この不稔性植物体生産キットの具体例としては、上記転写因子をコードする遺伝子と上記転写抑制転換ポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを少なくとも含んでいればよく、上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含んでいればより好ましい。上記試薬群としては、形質転換の種類に応じた酵素やバッファー等を挙げることができる。その他、必要に応じてマイクロ遠心チューブ等の実験用素材を添付してもよい。

[0226] (IV) 葯の裂開が制御された不稔性植物体の生産方法

本発明者は、NACAD1や種々の植物に保存されている同様の転写因子が、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であることを初めて明らかにし、本発明を完成させるに至った。従ってかかる転写因子をコードする遺伝子を利用して、葯の裂開が制御された不稔性植物体を生産する方法も本発明に含まれる。

[0227] すなわち、本発明にかかる葯の裂開が制限された不稔性植物体の生産方法は、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質をコードする遺伝子、  
(a) 配列番号136に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、  
(b) 配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、



欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、蒴の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質、

或いは、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子、

(c) 配列番号137に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子、

(d) 配列番号137に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、蒴の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子をコードする遺伝子、

を用いるものである。

[0228] また上記タンパク質としては、配列番号136に示されるアミノ酸配列に対して、20%以上、好ましくは50%以上、さらに好ましくは60%または70%以上の相同性を有するタンパク質であって、且つ、蒴の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質も含まれる。このようなタンパク質としては、例えば、上記相同性が52%のタンパク質であって、配列番号136に示されるアミノ酸配列を有するNACAD1タンパク質と同じ機能を持つNAC因子が挙げられる。

[0229] この植物体の生産方法は、蒴の裂開に関与する上記転写因子をコードする遺伝子の発現を抑制させるか、過剰発現させることにより可能となる。上記遺伝子の発現を抑制する方法としては、例えば、アンチセンス法、ジーンターゲットイング法、RNAi法、コサプレッション法、遺伝子破壊型タギング法等を挙げることができる。また、上記遺伝子を過剰発現させる方法としては、例えば、適当なプロモーターとその下流に配置された上記遺伝子とを含むベクターを構築し、植物に導入する方法を挙げることができる。

[0230] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[0231] (実施例)

以下、実施例及び図1(a)ないし図16に基づいて本発明をより詳細に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0232] [实施例1]

以下の実施例においては、転写抑制転換ペプチドのひとつである12アミノ酸ペプチドLDLDLELRGFA(SRDX) (配列番号17)をコードするポリヌクレオチドを、APE TALA3遺伝子と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターの下流につないで、組換え発現ベクターを構築し、これをシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入することにより、シロイヌナズナを形質転換した。

[0233] (1)植物形質転換用ベクターpBIG2の構築

クローンテック社製(Clontech 社、USA)のプラスミドp35S-GFPを制限酵素Hind IIIとBamHIで切断し、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分離し回収した。

[0234] 米国ミシガン州立大学より譲渡された植物形質転換用ベクターpBIG-HYG (

Becker, D. 1990 Nucleic Acid Research, 18:203)を制限酵素HindIIIとSstIとで切断し、アガロースゲル電気泳動によってGUS遺伝子を除いたDNA断片を得た。

[0235] 以下の配列を有するDNAを合成し、70℃で10分、加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。このDNA断片は、5'末端から、BamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、制限酵素部位SmaI、および制限酵素部位SalIとSstIとをこの順に有する。

5'-GATCCACAATTACCAACAACAACAAACAACAAACATTACAATTACAG  
ATCCCGGGGGTACCGTCGACGAGCT-3' (配列番号159)

5'-CGTCGACGGTACCCCCGGGATCTGTAATTGTAATGTTGTTTGTGTTGTTGT  
TGTTGTTGGTAATTGTG-(配列番号160)

[0236] 次に、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター領域を含むDNA断片と、合成した2本鎖DNAとを、GUS遺伝子を除いたpBIG-HYGのHindIII、SstI部位に挿入し、植物形質転換用ベクターpBIG2を得た。

[0237] (2)組換え発現ベクターpAPETALA3SRDXの構築

### <APETALA3cDNAの単離>

シロイヌナズナcDNAライブラリーより、以下のプライマーを用いて終止コドンを除く

APETALA3のコード領域のみを含むDNA断片をPCRを用いて増幅し、アガロースゲル電気泳動により分離し回収した。PCRの条件は、変性反応94℃1分、アニーリング反応47℃2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとして25サイクル行った。以下すべてのPCR反応は同じ条件で行った。

5'プライマー

5' - GATGGCGAGAGGGAAGATCCAGATCAAG - 3' (配列番号161)

3'プライマー

5' - TTCAAGAAGATGGAAGGTAATGATG - 3' (配列番号162)

APETALA3遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号135および134に示す。

[0238] <転写抑制転換ペプチドLDLDLELRLGFA (SRDX)をコードするポリヌクレオチドの合成>

12アミノ酸ペプチドLDLDLELRLGFA (SRDX)をコードし、3'末端に終止コドンTAAを持つように設計した、以下の配列を有するDNAをそれぞれ合成し、70℃で10分、加温した後、自然冷却によりアニーリングさせて2本鎖DNAとした。

5'-CTGGATCTGGATCTAGAACTCCGTTTGGGTTTCGCTTAAG-3' (配列番号163)

5'-CTTAAGCGAAACCCAAACGGAGTTCTAGATCCAGATCCAG-3' (配列番号164)

[0239] <組換え発現ベクターの構築>

上記で得たAPETALA3遺伝子のタンパク質コード領域のみを含むDNA断片と転写抑制転換ペプチドSRDXのコード領域を含むDNA断片とを、制限酵素SmaIで切断した上記pBIG2に挿入し、順方向にクローニングされているものを単離し、組換え発現ベクターであるプラスミドp35S::APETALA3SRDXを得た。

[0240] (3)組換え発現ベクターp35S::APETALA3SRDXにより形質転換した植物体の作成

p35S::APETALA3SRDXによるシロイヌナズナの形質転換は、Transformation of *Arabidopsis thaliana* by vacuum

infiltration(<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>)に従った。ただし、感染させるのにバキュームは用いないで、浸すだけにした。p35S::APETALA3SRD Xを、土壌細菌 *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101 (C58C1Rif<sup>r</sup>) pMP90 (Gmr)(koncz and Schell 1986)株にエレクトロポレーション法で導入した。導入した菌を1リットルの、抗生物質(カナマイシン(Km) 50  $\mu$ g/ml、ゲンタマイシン(Gm) 25  $\mu$ g/ml、リファンピシリン(Rif) 50  $\mu$ g/ml)を含むYEP培地でOD600が1になるまで培養した。次いで、培養液から菌体を回収し、1リットルの感染用培地(Infiltration medium、下表2)に懸濁した。

[0241] [表2]

Infiltration medium (1 l )	
MS salt	2.29g
スクロース	50g
MES to pH5.7 with KOH	0.5g
benzylaminopurine	0.044 $\mu$ M
Silwet L-77	0.2ml

[0242] この溶液に、14日間生育したシロイヌナズナを1分間浸し、感染させた後、再び生育させて結種させた。回収した種子を50%ブリーチ、0.02%Triton X-100溶液で7分間滅菌した後、滅菌水で3回リンスし、滅菌したハイグロマイシン選択培地(下表3)に蒔種した。

[0243] [表3]

ハイグロマイシン選択培地	
MS salt	4.3g/l
スクロース	1%
MES to pH 5.7 with KOH	0.5g/l
Phytagar	0.8%
ハイグロマイシン	30g/ml
バンコマイシン	500ml

[0244] 上記ハイグロマイシンプレートで生育する形質転換植物体を選抜し、成長させた。

このようにして、p35S::APETALA3SRDXで形質転換された、成長した植物体を15ライン取得した。植物体の一例を図1(a)～図1(c)に示す。

[0245] 図1(a)に示すように、p35S::APETALA3SRDXで形質転換された植物体では、全ての花器において、花弁と雄しべが形成されていないかった。その一方で、雌しべは正常に形成されていた。

[0246] また、図1(b)に示す、植物体の拡大図からわかるように、花器では、雌しべの柱頭が露出し、花弁と雄しべが欠損していた。さらに、図1(c)に示す花器の拡大図からわかるように、花弁および雄しべが明白に欠損していた。このような花器の正常でない形状は、APETALA3遺伝子の変異株における花器の形状と、同一なものであった。なお、以上の結果は、得られた15ラインの形質転換植物体の全てにおいて、同様なものであった。

[0247] このように、p35S::APETALA3SRDXで形質転換された植物体は、萼および雄しべが欠損した、正常な花粉形成が行われないう変異体であった。なお、この植物体の雌しべに、野生型の植物体の花粉を授粉すると、種子が形成された。このことから、p35S::APETALA3SRDXで形質転換された植物体は、雌しべが稔性を有した雄性不稔体であることが確認できた。

[0248] [実施例2]

本実施例においては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターと、ノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域との間に、転写抑制転換ペプチドのひとつである12アミノ酸ペプチドLDLDLELRLGFA(SRDX)(配列番号17)をコードするポリヌクレオチドをNACAD1遺伝子の下流に結合したポリヌクレオチドを組み込んだ組換え発現ベクターを構築し、これをシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入することにより、シロイヌナズナを形質転換した。

[0249] <形質転換用ベクター構築用ベクターの構築>

形質転換用ベクター構築用ベクターであるp35SGを、図2に示すように、以下の工程(1)～(4)のとおり構築した。

[0250] (1)インビトロジェン社製pENTRベクター上のattL1、attL2のそれぞれの領域をプライマーattL1-F(配列番号142)、attL1-R(配列番号143)、attL2-F(配列

番号144)、attL2-R(配列番号145)を用いてPCRにて増幅した。得られたattL1断片を制限酵素HindIII、attL2断片をEcoRIで消化し、精製した。PCR反応の条件は、上述のとおりである。

[0251] (2)クローンテック社製(Clontech社、USA)のプラスミドpBI221を制限酵素XbaIとSacIで切断した後、アガロースゲル電気泳動でGUS遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター(以下の説明では、便宜上、CaMV35Sと称する)とノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域(以下の説明では、便宜上、Nos-terと称する)を含む35S-Nosプラスミド断片DNAを得た。

[0252] (3)以下の配列番号146、147の配列を有するDNA断片を合成し、90℃で2分間加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させた。これを上記35S-Nosプラスミド断片DNAのXbaI-SacI領域にライゲーションし、p35S-Nosプラスミドを完成させた。配列番号146、147の配列を有するDNA断片には、5'末端にBamHI制限酵素部位、翻訳効率を高めるタバコモザイクウイルス由来のomega配列、及び制限酵素部位SmaI、SalI、SstIがこの順に含まれる。

5'-ctagaggatccacaattaccaacaacaacaacaacaacattacaattacagatcccgggggtaccgtcgcgagctc-3'(配列番号146)

5'-cgtcgacgggtacccccgggatctgtaattgtaattgttgtttgttgttgttgttggtaattgtggatcct-3'(配列番号147)

[0253] (4)このp35S-Nosプラスミドを制限酵素HindIIIで消化し、上記attL1断片を挿入した。さらにこれをEcoRIで消化し、attL2断片を挿入して、ベクターp35SGを完成させた。

[0254] <転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターの構築>

転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターであるp35SSRDXGを、図3に示すように、以下の工程(1)〜(2)のとおり構築した。

[0255] (1)12アミノ酸転写抑制転換ペプチドLDLDLELRGFA(SRDX)をコードし、3'末

端に終止コドンTAAを持つように設計した、以下の配列を有するDNAをそれぞれ合成し、70℃で10分加温した後、自然冷却によりアニールさせて2本鎖DNAとした。

5'-gggcttgatctggatctagaactccgtttgggtttcgcttaag-3' (配列番号148)

5'-tcgacttaagcgaaacccaaacggagttagatccagatcaagccc-3' (配列番号149)

[0256] (2) p35SGを制限酵素SmaI、SalIで消化し、この領域に上記のSRDXをコードする2本鎖DNAを挿入して、p35SSRDXGを構築した。

[0257] <形質転換用ベクターの構築>

構築用ベクターのatt部位で挟まれたDNA断片と組換えるための、2つのatt部位を有する植物形質転換用ベクターであるpBIGCKHを、図6に示すように、以下の工程(1)から(3)のとおり構築した。

[0258] (1) 米国ミシガン州立大学より譲渡されたpBIG (Becker, D. Nucleic Acids Res. 18:203,1990)を制限酵素HindIII、EcoRIで消化し、GUS、Nos領域を電気泳動で除いた。

[0259] (2) インビトロジェン社から購入したGateway(登録商標)ベクターコンバージョンシステムのFragmentAをプラスミドpBluscriptのEcoRVサイトに挿入した。これをHindIII-EcoRIで消化し、FragmentA断片を回収した。

[0260] (3) 回収したFragmentA断片を上記のpBIGプラスミド断片とライゲーションを行い、pBIGCKHを構築した。これらは大腸菌DB3. 1 (インビトロジェン社)でのみ増殖可能で、クロラムフェニコール耐性、カナマイシン耐性である。

[0261] <構築用ベクターへのNACAD1遺伝子の組み込み>

上記構築用ベクターp35SSRDXGにシロイヌナズナ由来の転写因子NACAD1タンパク質をコードする遺伝子を以下の工程(1)〜(3)のとおり組み込んだ。

[0262] (1) シロイヌナズナ葉から調整したmRNAを用いて作成したcDNAライブラリーから、以下のプライマーを用いて、終止コドンを除くシロイヌナズナNACAD1遺伝子のコード領域のみを含むDNA断片をPCRにて増幅した。

プライマー1 (NACAD1-F) 5'-GATGATGTCAAATCTATGAGCATATC-3' (配列番号155)

プライマー2 (NACAD1-R) 5'-TCCACTACCATTCGACACGTGAC-3' (配列番号

156)

NACAD1遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号137および136に示す。

[0263] (2)得られたNACAD1コード領域のDNA断片を、図3に示すように、予め制限酵素SmaIで消化しておいた構築用ベクターp35SSRDXGのSmaI部位にライゲーションした。

[0264] (3)このプラスミドで大腸菌を形質転換し、プラスミドを調整して、塩基配列を決定し、順方向に挿入されたクローンを単離し、SRDXとのキメラ遺伝子となったものを得た。

[0265] <組換え発現ベクターの構築>

上記構築用ベクター上にあるCaMV35Sプロモーター、キメラ遺伝子、Nos-ter等を含むDNA断片を、植物形質転換用ベクターpBIGCKHに組換えることにより、植物を宿主とする発現ベクターを構築した。組換え反応はインビトロジェン社のGateway (登録商標)LR clonase (登録商標)を用いて以下の工程(1)～(3)のとおりに行った。

[0266] (1)まず、p35SSRDXG 1.5  $\mu$ L (約300ng)とpBIGCKH 4.0  $\mu$ L (約600ng)に5倍希釈したLR buffer 4.0  $\mu$ LとTE緩衝液(10mM TrisCl pH7.0、1mM EDTA) 5.5  $\mu$ Lを加えた。

[0267] (2)この溶液にLR clonase 4.0  $\mu$ Lを加えて25℃で60分間インキュベートした。続いて、proteinase K 2  $\mu$ Lを加えて37℃で10分間インキュベートした。

[0268] (3)その後、この溶液1～2  $\mu$ Lを大腸菌(DH5a等)に形質転換し、カナマイシンで選択した。

[0269] <組換え発現ベクターにより形質転換した植物体の生産>

次に、以下の工程(1)～(3)に示すように、上記キメラ遺伝子を含むDNA断片をpBIGCKHに組み込んだプラスミドであるpBIG-NACAD1SRDXで、シロイヌナズナの形質転換を行い、形質転換植物体を生産した。シロイヌナズナ植物の形質転換は、Transformation of Arabidopsis thaliana by vacuum infiltration(<http://www.bch.msu.edu/pamgreen/protocol.htm>)に従った。ただし、感



染させるのにバキュームは用いないで、浸すだけにした。

- [0270] (1) まず得られたプラスミド、pBIG-NACAD1SRDXを、土壌細菌((*Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101(C58C1Rif<sup>r</sup>)pMP90(Gmr)(koncz and Sahell 1986))株にエレクトロポレーション法で導入した。導入した菌を1リットルの、抗生物質(カナマイシン(Km) 50  $\mu$ g/ml、ゲンタマイシン(Gm) 25  $\mu$ g/ml、リファンピシリン(Rif) 50  $\mu$ g/ml)を含むYEP培地でOD600が1になるまで培養した。次いで、培養液から菌体を回収し、1リットルの感染用培地(Infiltration medium、上表2)に懸濁した。
- [0271] (2) この溶液に、14日間育成したシロイヌナズナを1分間浸し感染させた後、再び育成させ結種させた。なお、アグロバクテリウムを感染させた世代では、胚珠の生存を妨げる場合を除き、一般に形質転換遺伝子の影響は出ない。そのため、蒴の裂開の抑制は起こらず結種した。回収した種子を25%ブリーチ、0.02% Triton X-100溶液で7分間滅菌した後、滅菌水で3回リンスし、滅菌したハイグロマイシン選択培地(上表3)に蒴種した。
- [0272] (3) 蒴種した約2000粒の種子から平均して50個体のハイグロマイシン耐性植物である形質転換植物体を得た。これらの植物から全RNAを調整し、RT-PCRを用いてNACAD1SRDXの遺伝子が導入されていることを確認した。
- [0273] pBIG-NACAD1SRDXで形質転換された植物体の数個体について、蒴の形状を走査型電子顕微鏡(JSM-6330F、日本電子製)で観察した。その結果を図7(a)に示す。図7(b)は野生型のシロイヌナズナの蒴の形状を同様に走査型電子顕微鏡で観察した結果を示している。図7(a)に示されているように、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換されたシロイヌナズナでは蒴の裂開が起こっていない。このように、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換されたシロイヌナズナでは、蒴の裂開は完全に起こっていないか、或いは、図には示していないが、不完全にしか起こっていないことが確認された。結果として、図8右側に示すように、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換されたシロイヌナズナ植物体では、果実、種子が殆ど形成されなかった。なお、図8左側は、シロイヌナズナの野生株を示す。
- [0274] また、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換された37個体の植物体について、各

個体で収穫された種子の質量の、種子以外の地上部の乾燥重量に対する割合を調べ、正常に結実する全く別のシロイヌナズナ植物体群と比較した。図9(a)、図9(b)にその結果を示す。図9(a)、(b)のグラフにおいて、縦軸は個体数、横軸は(収穫された種子の質量/種子以外の地上部の乾燥重量)×100の階級値を示す。例えば横軸の20は、(収穫された種子の質量/種子以外の地上部の乾燥重量)×100の計算値が10より大きく20以下の階級であることを意味する。図9(a)に示されているように、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換された植物体群では、正常に結実する植物体群(図9(b))に比べて各個体で収穫された種子の質量の、種子以外の地上部の乾燥重量に対する割合が低下した個体が数多く観察された。ここで種子の質量とは、1個体全体で収穫された種子の質量の合計をいう。これは、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換された植物体群は自然状態では葯の裂開が抑えられるので、種子が殆どできなかったことを示している。また、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換された植物体群において得られた種子は、不完全に裂開した葯から放出された花粉を自家受粉したことにより得られたものである。

[0275] さらに、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換され、葯の裂開が抑制された植物体において、葯内の花粉を取り出して受粉させた場合に結実するかを調べた。図10に、裂開しなかった葯からピンセットで無理やり花粉を取り出して受粉させた場合を矢印で、何も行なわなかった場合を矢頭で示す。図10の矢印部分に示されているように、葯の裂開が完全に抑制された場合においても、花粉を取り出して受粉させたところ結実したことから、花粉自体は稔性を有していることが確認された。この結果より、pBIG-NACAD1SRDXで形質転換された植物体は、花粉自体には稔性があるが、葯が裂開しないため受粉できず、結果として結実しないことがわかった。また、葯が裂開しない花に受粉させたところ、結実したことから、雌性器官(雌しべ)は稔性を有していることが確認された。

[0276] 〔実施例3〕

本実施例においては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターと、ノパリン合成酵素遺伝子の転写終止領域との間に、転写抑制転換ペプチドのひとつである12アミノ酸ペプチドLDLDLELRGFA(SRDX)(配列番号17)をコードするポリヌクレオ

チドをシロイヌナズナMYB26遺伝子の下流に結合したポリヌクレオチドを組み込んだ組換え発現ベクターを構築し、これをシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入することにより、シロイヌナズナを形質転換した。

[0277] <形質転換用ベクター構築用ベクターの構築>

形質転換用ベクター構築用ベクターであるp35SGを、図2に示すように、実施例2と同様の方法で構築した。

[0278] <転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターの構築>

転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターであるp35SSRDXGを、図3に示すように、実施例2と同様の方法で構築した。

[0279] <形質転換用ベクターの構築>

構築用ベクターのatt部位で挟まれたDNA断片と組換えるための、2つのatt部位を有する植物形質転換用ベクターであるpBIGCKHを、図6に示すように、実施例2と同様の方法で構築した。

[0280] <構築用ベクターへのMYB26遺伝子の組み込み>

上記構築用ベクターp35SSRDXGにシロイヌナズナ由来の転写因子MYB26タンパク質をコードする遺伝子を以下の工程(1)～(3)のとおり組み込んだ。

[0281] (1)シロイヌナズナ葉から調整したmRNAを用いて作成したcDNAライブラリーから、以下のプライマーを用いて、終止コドンを除くMYB26遺伝子のコード領域のみを含むDNA断片をPCRにて増幅した。

プライマー1(MYB26-F) 5'-GATGGGTCATCACTCATGCTGCAACAAGCA-3' (配列番号157)

プライマー2(MYB26-R) 5'-AGTTATGACGTACTGTCCACAAGAGATTGG-3' (配列番号158)

MYB26遺伝子のcDNAおよびコードするアミノ酸配列をそれぞれ配列番号139および138に示す。

[0282] (2)得られたMYB26コード領域のDNA断片を、図4に示すように、予め制限酵素SmaIで消化しておいた構築用ベクターp35SSRDXGのSmaI部位にライゲーション

した。

- [0283] (3)このプラスミドで大腸菌を形質転換し、プラスミドを調整して、塩基配列を決定し、順方向に挿入されたクローンを単離し、SRDXとのキメラ遺伝子となったものを得た。

[0284] <組換え発現ベクターの構築>

上記構築用ベクター上にあるCaMV35Sプロモーター、キメラ遺伝子、Nos-ter等を含むDNA断片を、植物形質転換用ベクターpBIGCKHに組換えることにより、植物を宿主とする発現ベクターを構築した。組換え反応はインビトロジェン社のGateway (登録商標) LR clonase (登録商標) を用いて、p35SSRDXGの代わりにMYB26のコード領域が順方向に挿入されたp35SMYB26SRDXGを用いる他は、実施例2の<組換え発現ベクターの構築>に記載した方法と同様の方法によって行った。

[0285] <組換え発現ベクターにより形質転換した植物体の生産>

次に、上記キメラ遺伝子を含むDNA断片をpBIGCKHに組み込んだプラスミドであるpBIG-MYB26SRDXで、シロイヌナズナの形質転換を行い、形質転換植物体を生産した。形質転換植物体の生産は、pBIG-NACAD1SRDXの代わりにpBIG-MYB26SRDXを用いた他は、実施例2の<組換え発現ベクターにより形質転換した植物体の生産>に記載した方法と同様の方法で行った。

- [0286] 上記滅菌したハイグロマイシン選択培地(上表3)に蒔種した約5000粒の種子から平均して60個体のハイグロマイシン耐性植物である形質転換植物体を得た。これらの植物から全RNAを調整し、RT-PCRを用いてMYB26SRDXの遺伝子が導入されていることを確認した。

- [0287] pBIG-MYB26SRDXで形質転換された植物体の数個体について、蒴の形状を走査型電子顕微鏡(JSM-6330F、日本電子製)で観察した。その結果を図11(b)に示す。図11(a)は野生型のシロイヌナズナの蒴の形状を同様に走査型電子顕微鏡で観察した結果を示している。図11(b)に示されているように、pBIG-MYB26SRDXで形質転換されたシロイヌナズナでは蒴の裂開が起こっていない。このように、pBIG-MYB26SRDXで形質転換されたシロイヌナズナでは、殆どの場合蒴の裂開は完全に起こっていなかった。或いは、図には示していないが、蒴の裂開が起こって

いる場合でも不完全にしか起こっていなかった。

- [0288] また、pBIG-MYB26SRDXで形質転換された22個体の植物体について、各個体で結実したさやの数の、開花した花の数に対する割合を調べ、正常に結実する全く別のシロイヌナズナ植物体群と比較した。図12にその結果を示す。図12(a)、図12(b)のグラフにおいて、縦軸は個体数、横軸は(結実したさやの数/開花した花の数)×100の階級値を示す。例えば横軸の20は、(結実したさやの数/開花した花の数)×100の計算値が10より大きく20以下の階級であることを意味する。
- [0289] 図12(b)に示されているように、pBIG-MYB26SRDXで形質転換された植物体群では、正常に結実する植物体群(図12(a))に比べて各個体で結実したさやの数の、開花した花の数に対する割合が低下した個体が数多く観察された。結実したさやの数の、開花した花の数に対する割合が0より大きく10以下である植物体が22個体中11個体あり、種子が殆ど形成されなかった個体の割合が高いことを示している。これは、pBIG-MYB26SRDXで形質転換された植物体群は自然状態では葯の裂開が抑えられるので、種子が殆どできなかったことを示している。
- [0290] また、pBIG-MYB26SRDXで形質転換された植物体群において得られた種子は、不完全に裂開した葯から放出された花粉を自家受粉したことにより得られたものである。なお、「結実したさやの数」とは、1個体全体において、種子が形成されたさや(長角果)の総数をいう。
- [0291] さらに、pBIG-MYB26SRDXで形質転換され、葯の裂開が抑制された植物体において、葯内の花粉を取り出して受粉させた場合に結実するかを調べた。その結果、葯の裂開が完全に抑制された場合においても、花粉を取り出して受粉させたところ結実したことから、花粉自体は稔性を有していることが確認された。この結果より、pBIG-MYB26SRDXで形質転換された植物体は、花粉自体には稔性があるが、葯が裂開しないため受粉できず、結果として結実しないことがわかった。また、葯が裂開しない花に受粉させたところ、結実したことから、雌性器官(雌しべ)は稔性を有していることが確認された。
- [0292] 〔実施例4〕
- 以下の実施例4においては、カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターと、ノパ

リン合成酵素遺伝子の転写終止領域との間に、転写抑制転換ペプチドのひとつである12アミノ酸ペプチドLDLDLELRLGFA (SRDX) (配列番号17)をコードするポリヌクレオチドをAG遺伝子の下流に結合したポリヌクレオチドを組み込んだ組換え発現ベクターを構築し、これをシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入することにより、シロイヌナズナを形質転換した。

[0293] <形質転換用ベクター構築用ベクターの構築>

形質転換用ベクター構築用ベクターであるp35SGを、図2に示すように、実施例2と同様の方法で構築した。

[0294] <転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターの構築>

転写抑制転換ペプチドをコードするポリヌクレオチドを組み込んだ構築用ベクターであるp35SSRDXGを、図3に示すように、実施例2と同様の方法で構築した。

[0295] <形質転換用ベクターの構築>

構築用ベクターのatt部位で挟まれたDNA断片と組換えるための、2つのatt部位を有する植物形質転換用ベクターであるpBIGCKHを、図6に示すように、実施例2と同様の方法で構築した。

[0296] <構築用ベクターへのAGコード領域の組み込み>

上記構築用ベクターp35SSRDXGにシロイヌナズナ由来の転写因子AGタンパク質をコードするDNA配列または遺伝子を以下の工程(1)〜(3)のとおり組み込んだ。

[0297] (1)シロイヌナズナ完全長cDNA pda01673を鋳型として、以下のプライマーを用いて、終止コドンを除くAGポリヌクレオチド (At4g18960) のコード領域のみを含むDNA断片をPCRにて増幅した。

プライマー1 5'-atgaccgcgtaccaatcggagctaggagg-3' (配列番号150)

プライマー2 5'-cactaactggagagcggtttggtcttggcg-3' (配列番号151)

AGポリヌクレオチドのコードするアミノ酸配列およびAGポリヌクレオチドのcDNAをそれぞれ配列番号140および141に示す。

[0298] (2)得られたAGコード領域のDNA断片を、図5に示すように、予め制限酵素SmaI

で消化しておいた構築用ベクターp35SSRDXGのSmaI部位にライゲーションした。

- [0299] (3)このプラスミドで大腸菌を形質転換し、プラスミドを調整して、塩基配列を決定し、順方向に挿入されたクローンを単離し、SRDXとのキメラ遺伝子となったものを得た。

[0300] <組換え発現ベクターの構築>

上記構築用ベクター上にあるCaMV35Sプロモーター、キメラ遺伝子、Nos-ter等を含むDNA断片を、植物形質転換用ベクターpBIGCKHに組換えることにより、植物を宿主とする発現ベクターを構築した。組換え反応はインビトロジェン社のGateway (登録商標)LR clonase (登録商標)を用いて、p35SSRDXGの代わりにAGのコード領域が順方向に挿入されたp35SAGSRDXGを用いる他は、実施例2の<組換え発現ベクターの構築>に記載した方法と同様の方法によって行った。

[0301] <組換え発現ベクターにより形質転換した植物体の生産>

次に、上記キメラ遺伝子を含むDNA断片をpBIGCKHに組み込んだプラスミドであるpBIG-AGSRDXで、シロイヌナズナの形質転換を行い、形質転換植物体を生産した。形質転換植物体の生産は、pBIG-NACAD1SRDXの代わりにpBIG-AGSRDXを用いた他は、実施例2の<組換え発現ベクターにより形質転換した植物体の生産>に記載した方法と同様の方法で行った。

- [0302] 蒔種した約5000粒の種子から平均して50個体のハイグロマイシン耐性植物である形質転換植物体を得た。これらの植物から全RNAを調整し、RT-PCRを用いてAGSRDXの遺伝子が導入されていることを確認した。

- [0303] 次に、pBIG-AGSRDXで形質転換した植物体について、図13から図16に基づいて説明する。図13(a)は、pBIG-AGSRDXで形質転換し、完全な八重咲きとなったシロイヌナズナの花を示し、図13(b)は、花の形態が八重咲きとなったシロイヌナズナの全体を表す図である。pBIG-AGSRDXで形質転換したシロイヌナズナの花は、供試した28個体のうち16個体において、図13(a)に示すように、完全な八重咲き植物体が形成された。

- [0304] 図14(a)は、野生型のシロイヌナズナの花を示し、図14(b)は、AG変異体のシロイヌナズナの花を示す図である。野生型のシロイヌナズナが4つのがく、4つの花卉、6

つの雄しべ、1つの雌しべを有するのに対し、本発明に係る方法で形質転換したシロイヌナズナは、雄しべが花弁に変化し、雌しべとなるwhorl4に新たな花が形成された。AG変異体も同様の構成となるが、本発明に係る方法で形質転換したシロイヌナズナは、AG変異体と比較して、花弁同士の間隔が狭く、均整の取れた美しい八重咲き植物体を形成した。

[0305] 図15は、pBIG-AGSRDXで形質転換した28個体中10個体の、シロイヌナズナの花を示す。上記10個体では、不完全ながら八重咲き植物体が形成された。図16は、pBIG-AGSRDXで形質転換した28個体中2個体のシロイヌナズナの花を示す。上記2個体では、野生型に近い形態の花が形成された。

[0306] また、上記16個体は、雄しべも雌しべも形成されない完全不稔性植物体となった。上記10個体では、不完全な雄しべ様、雌しべ様器官が形成されたものの、種子は形成されなかった。すなわち、不稔性植物体が形成された。また、上記2個体においては雄しべおよび雌しべが形成されたが、種子形成数はきわめて少なかった。このように、pBIG-AGSRDXで形質転換された植物体は、すべて不稔性植物体となった。

[0307] なお、発明を実施するための最良の形態の項においてなした具体的な実施態様または実施例は、あくまでも、本発明の技術内容を明らかにするものであって、そのような具体例にのみ限定して狭義に解釈されるべきものではなく、本発明の精神と次に記載する特許請求の範囲内で、いろいろと変更して実施することができるものである。

#### 産業上の利用の可能性

[0308] 本発明にかかる不稔性植物体の生産方法では、以上のように、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制することによって、植物の雄性不稔体を生産する。

[0309] したがって、上記キメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子で目的の植物を形質転換すれば雄性不稔植物を生産することができ、複雑な遺伝子組み替え技術を利用することなく、非常に簡便に目的の植物を雄性不稔化することができるという効果を奏する。



- [0310] また、本発明で用いられるキメラタンパク質は、内在性の遺伝子に対して、優勢に作用するものである。そのため、植物が二倍体や複二倍体であったり、あるいは植物に機能重複遺伝子が存在したりしても、本発明にかかるキメラタンパク質は、該当する転写因子が制御する、花器形成に関わる遺伝子の発現を、一様に抑制できる。したがって、遺伝子導入可能なあらゆる植物を、雄性不稔体に容易に形質転換できるという効果を奏する。
- [0311] また、本発明で用いられる、花器形成に関わる遺伝子の転写を促進する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられるため、特定のモデル植物で構築したキメラタンパク質を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において簡便に雄性不稔体を生産できるという効果を奏する。
- [0312] 以上のように、本発明によれば、正常な花粉形成が行われないが、雌しべは稔性を有している、いわゆる雄性不稔植物体を、広範囲の植物で生産できる。それゆえ、本発明は、各種農業や林業、アグリビジネス、さらには農産物を加工する産業や食品産業等に利用可能であり、しかも非常に有用であると考えられる。
- [0313] 本発明に係る葯の裂開が抑制された植物体の生産方法は、以上のように、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させる構成を備えているので、葯の裂開に関与する遺伝子の発現が抑制され、葯の裂開が抑制された植物体を生産することが可能となる。
- [0314] したがって、上記キメラタンパク質をコードするキメラ遺伝子で目的の植物を形質転換すれば葯の裂開が抑制された植物を生産することができ、複雑な遺伝子組み替え技術を利用することなく、非常に簡便に目的の植物の葯の裂開を抑制することができるという効果を奏する。
- [0315] また、本発明で用いられるキメラタンパク質は、内在性の遺伝子に対して、優勢に作用するものであるため、本発明にかかるキメラタンパク質は、植物が二倍体や複二倍体であったり、あるいは植物に機能重複遺伝子が存在したりしても、葯の裂開に関わる遺伝子の発現を一様に抑制でき、遺伝子導入可能なあらゆる植物を、葯の裂開

が抑制された植物体に容易に形質転換できるという効果を奏する。

- [0316] また、本発明で用いられる、蒴の裂開に関わる遺伝子の転写を促進する転写因子のアミノ酸配列は、種の異なる数多くの植物間において、保存性が高いものと考えられるため、特定のモデル植物で構築したキメラタンパク質を、他の植物に導入することで、さまざまな種の植物において簡便に蒴の裂開が抑制された植物体を生産できるという効果を奏する。
- [0317] 以上のように、蒴の裂開に関与する遺伝子の転写を抑制することによって蒴の裂開が抑制された植物体を得ることができる。それゆえ、本発明は、各種農業や林業、アグリビジネス、さらには農産物を加工する産業や食品産業等に利用可能であり、しかも非常に有用であると考えられる。
- [0318] また、本発明に係る不稔性植物体の生産方法は、以上のように、雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、上記転写因子の標的遺伝子の転写を抑制することにより、八重咲き植物体を生産するという構成を備えているので、短期間に、簡便、確実に八重咲き植物体を生産することができるという効果を奏する。
- [0319] 以上のように、AG転写因子が標的とする遺伝子の転写を抑制することによって八重咲き植物体または不稔性植物体を得ることができる。それゆえ、本発明は、各種農業、園芸業、造園業、アグリビジネス等に利用可能であり、しかも非常に有用であると考えられる。

### 請求の範囲

- [1] 花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、植物体を不稔化することを特徴とする不稔性植物体の生産方法。
- [2] 花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させ、花器形成に関与する遺伝子の発現を抑制することを特徴とする不稔性植物体の生産方法。
- [3] 上記花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子が、雄しべまたは雌しべの形成に関与する転写因子であることを特徴とする請求項1に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [4] 上記不稔性植物体は、少なくとも雄しべの形成が阻害されていることを特徴とする、請求項1から3のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [5] 上記雄しべまたは雌しべの形成に関与する転写因子が、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子であって、上記転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させることにより、葯の裂開を抑制することを特徴とする請求項3に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [6] 上記葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子がMYBドメインを有する転写因子であって、上記転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を、植物体で生産させ、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を抑制することを特徴とする請求項5に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [7] 上記植物体は、さらに、雌性器官が稔性を有していることを特徴とする請求項5または6に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [8] 上記植物体は、さらに、花粉自体が稔性を有することを特徴とする請求項5から7のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [9] 雄しべおよび雌しべの形成に関与する転写因子と、任意の転写因子を転写抑制因

子に転換する機能性ペプチドとを融合させたキメラタンパク質を植物体で生産させることにより、花の形態を八重咲きにすることを特徴とする不稔性植物体の生産方法。

- [10] 上記転写因子をコードする遺伝子と上記機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいることを特徴とする請求項1〜4のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [11] さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいることを特徴とする請求項10に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [12] 上記転写因子をコードする遺伝子と上記機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいることを特徴とする請求項1, 3または5〜8のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [13] さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいることを特徴とする請求項12に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [14] 上記転写因子をコードする遺伝子と上記機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドとからなるキメラ遺伝子を含む組換え発現ベクターを、植物細胞に導入する形質転換工程を含んでいることを特徴とする請求項1, 3または9のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [15] さらに、上記組換え発現ベクターを構築する発現ベクター構築工程を含んでいることを特徴とする請求項14に記載の不稔性植物体の生産方法。
- [16] 上記転写因子が、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることを特徴とする請求項1〜4, 10または11のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。
- (a) 配列番号134に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。
- (b) 配列番号134に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する機能を有するタンパク質。
- [17] 上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることを特徴とする請求項10または11に記載の不稔性植物体の生産方法。

(c) 配列番号135に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

(d) 配列番号135に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、花器形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子。

- [18] 上記転写因子が、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることを特徴とする請求項1, 3, 5, 7, 8, 12または13のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(a) 配列番号136に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質。

- [19] 上記転写因子が、配列番号136に示されるアミノ酸配列に対して50%以上の相同性を有し、且つ、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質であることを特徴とする請求項1, 3, 5, 7, 8, 12または13のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

- [20] 上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることを特徴とする請求項12または13のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(c) 配列番号137に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

(d) 配列番号137に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、葯の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子をコードする遺伝子。

- [21] 上記転写因子が、以下の(a)又は(b)記載のタンパク質であることを特徴とする請求項1, 3, 6〜8, 12または13のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(a) 配列番号138に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号138に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、

欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、且つ、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質。

- [22] 上記タンパク質をコードする遺伝子として、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子が用いられることを特徴とする請求項12または13のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(c) 配列番号139に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子、

(d) 配列番号139に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進するタンパク質をコードする遺伝子。

- [23] 上記転写因子が、以下の(a)または(b)記載のタンパク質であることを特徴とする請求項1, 3, 9, 14または15のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(a) 配列番号140に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質。

(b) 配列番号140に示されるアミノ酸配列において、1個または数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／または付加されたアミノ酸配列からなるタンパク質。

- [24] 上記転写因子をコードする遺伝子として、以下の(c)または(d)記載の遺伝子が用いられることを特徴とする請求項14または15のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(c) 配列番号141に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子。

(d) 配列番号141に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつ、雄しべおよび雌しべの形成に関与するタンパク質をコードする遺伝子。

- [25] 以下の(a)又は(b)記載のタンパク質をコードする遺伝子、

(a) 配列番号136に示されるアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号136に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列からなり、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する機能を有するタンパク質、

或いは、以下の(c)又は(d)記載の遺伝子、  
(c)配列番号137に示される塩基配列をオープンリーディングフレーム領域として有する遺伝子、  
(d)配列番号137に示される塩基配列からなる遺伝子と相補的な塩基配列からなる遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズし、且つ、薬の裂開に関与する遺伝子の転写を促進する転写因子をコードする遺伝子、  
を用いることを特徴とする不稔性植物体の生産方法。

[26] 上記機能性ペプチドが、次に示す式(1)～(4)

(1) X1-Leu-Asp-Leu-X2-Leu-X3

(但し、式中、X1は0～10個のアミノ酸残基を示し、X2はAsn又はGluを示し、X3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(2) Y1-Phe-Asp-Leu-Asn-Y2-Y3

(但し、式中、Y1は0～10個のアミノ酸残基を示し、Y2はPhe又はIleを示し、Y3は少なくとも6個のアミノ酸残基を示す。)

(3) Z1-Asp-Leu-Z2-Leu-Arg-Leu-Z3

(但し、式中、Z1はLeu、Asp-Leu又はLeu-Asp-Leuを示し、Z2はGlu、Gln又はAspを示し、Z3は0～10個のアミノ酸残基を示す。)

(4) Asp-Leu-Z4-Leu-Arg-Leu

(但し、式中、Z4はGlu、Gln又はAspを示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

[27] 上記機能性ペプチドが、配列番号1～17のいずれかに示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

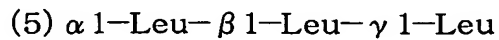
[28] 上記機能性ペプチドが、以下の(e)又は(f)記載のペプチドであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

(e)配列番号18または19に示されるアミノ酸配列を有するペプチド。

(f)配列番号18または19に示されるアミノ酸配列において、1個又は数個のアミノ酸

が置換、欠失、挿入、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有するペプチド。

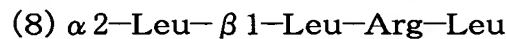
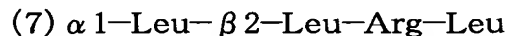
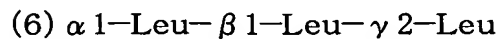
[29] 上記機能性ペプチドが、次に示す式(5)



(但し、式中  $\alpha 1$  は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\beta 1$  は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser又はHisを示し、 $\gamma 1$  は、Arg、Gln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又はAspを示す。)

で表されるアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

[30] 上記機能性ペプチドが、次に示す式(6)～(8)



(但し、各式中  $\alpha 1$  は、Asp、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\alpha 2$  は、Asn、Glu、Gln、Thr又はSerを示し、 $\beta 1$  は、Asp、Gln、Asn、Arg、Glu、Thr、Ser又はHisを示し、 $\beta 2$  はAsn、Arg、Thr、Ser又はHisを示し、 $\gamma 2$  はGln、Asn、Thr、Ser、His、Lys、又はAspを示す。)

のいずれかで表されるアミノ酸配列を有するものであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

[31] 上記機能性ペプチドが、配列番号20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、38、39、40または152に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

[32] 上記機能性ペプチドが、配列番号36または37に示されるアミノ酸配列を有するペプチドであることを特徴とする請求項1から25のいずれか1項に記載の不稔性植物体の生産方法。

[33] 請求項1から32のいずれか1項に記載の生産方法により生産された、不稔性植物体。

[34] 上記不稔性植物体には、成育した植物個体、植物細胞、植物組織、カルス、種子



の少なくとも何れかが含まれることを特徴とする請求項33に記載の不稔性植物体。

- [35] 請求項1から32のいずれか1項に記載の生産方法を行うためのキットであって、  
花器形成、雄しべまたは雌しべの形成、葯の裂開、または雄しべおよび雌しべの形成に関与する遺伝子の発現を促進する転写因子をコードする遺伝子と、任意の転写因子を転写抑制因子に転換する機能性ペプチドをコードするポリヌクレオチドと、プロモーターとを含む組換え発現ベクターを少なくとも含むことを特徴とする不稔性植物体生産キット。
- [36] さらに、上記組換え発現ベクターを植物細胞に導入するための試薬群を含むことを特徴とする請求項35に記載の植物の不稔性植物体生産キット。

[図1(a)]



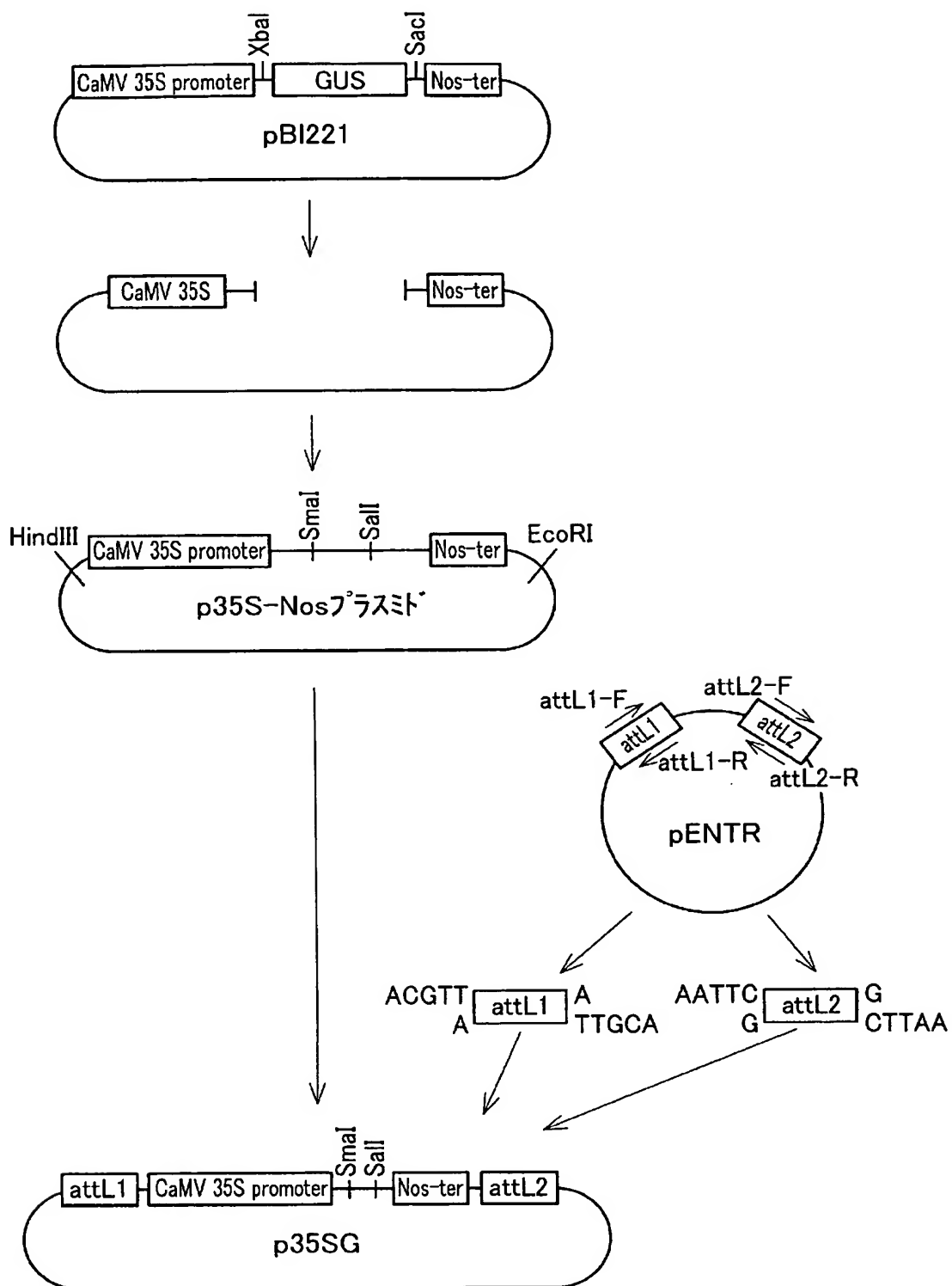
[図1(b)]



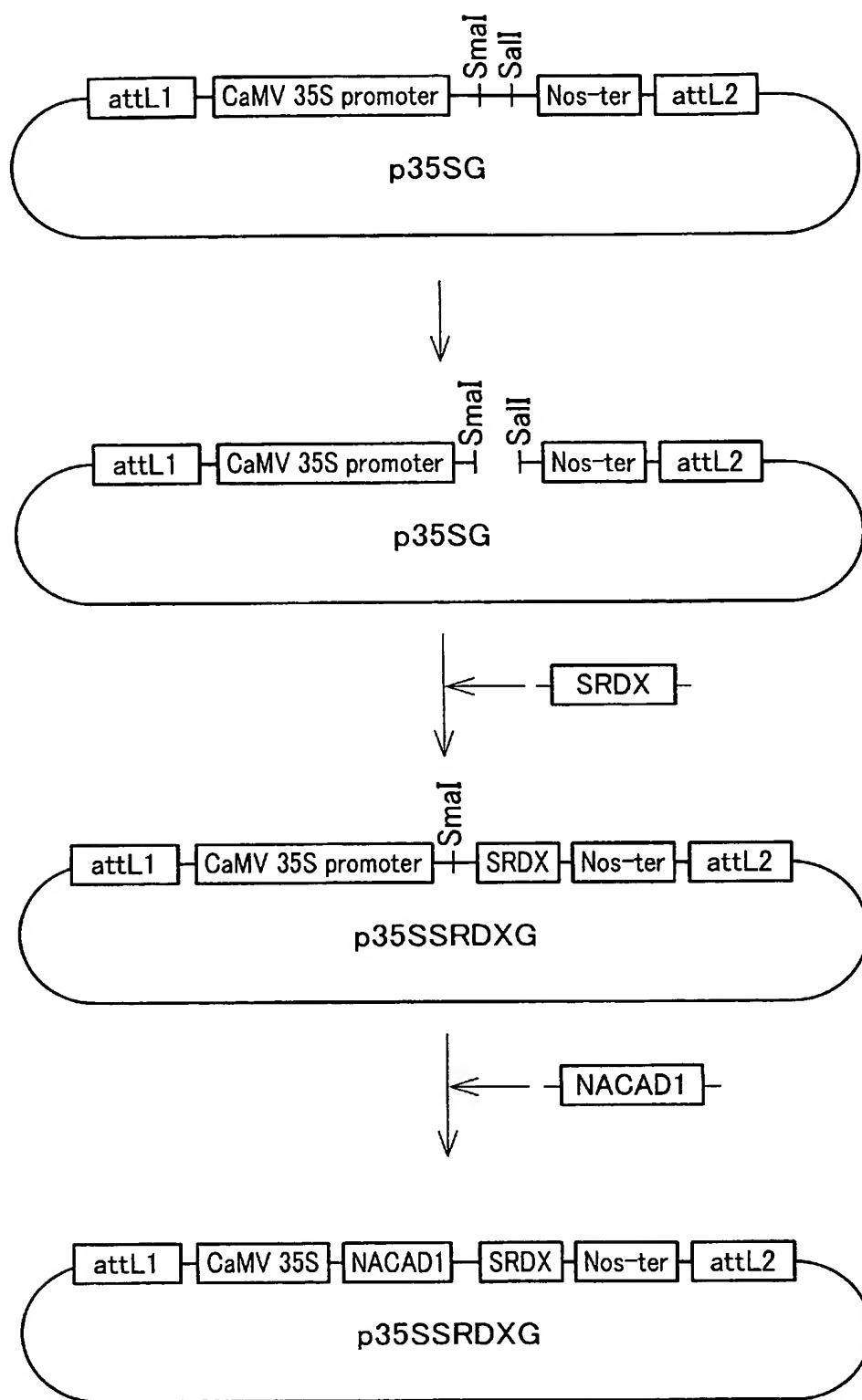
[図1(c)]



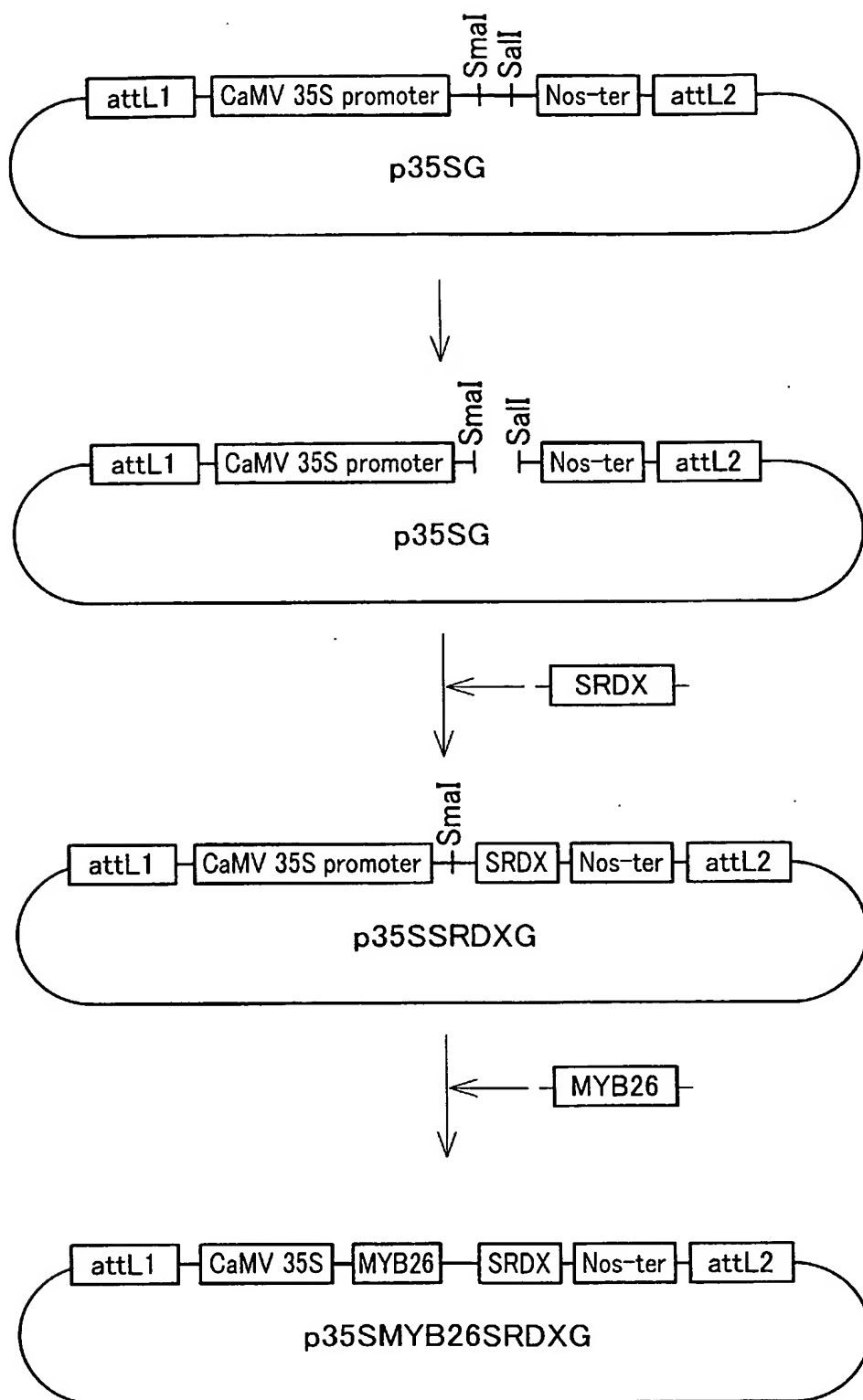
[図2]



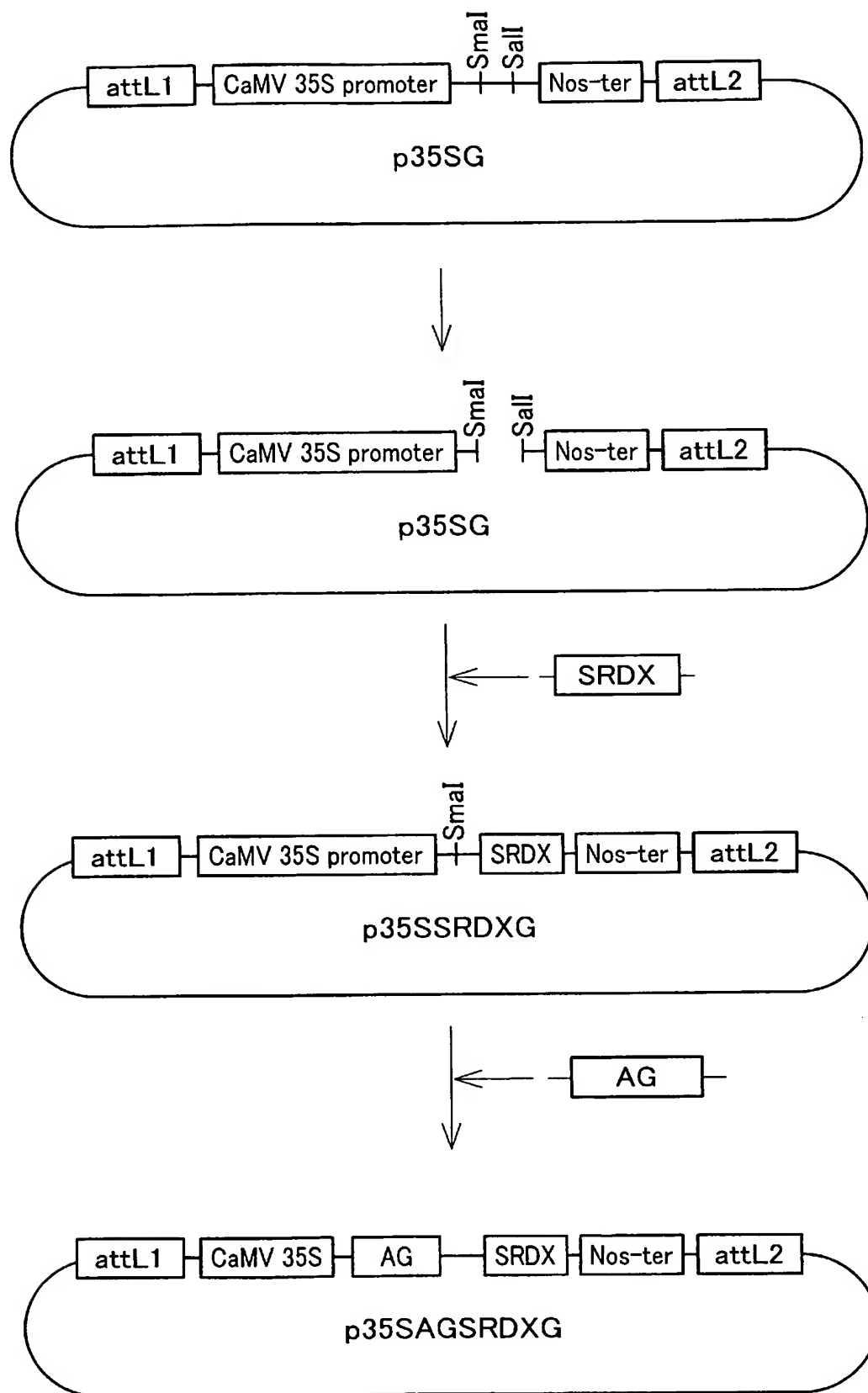
[図3]



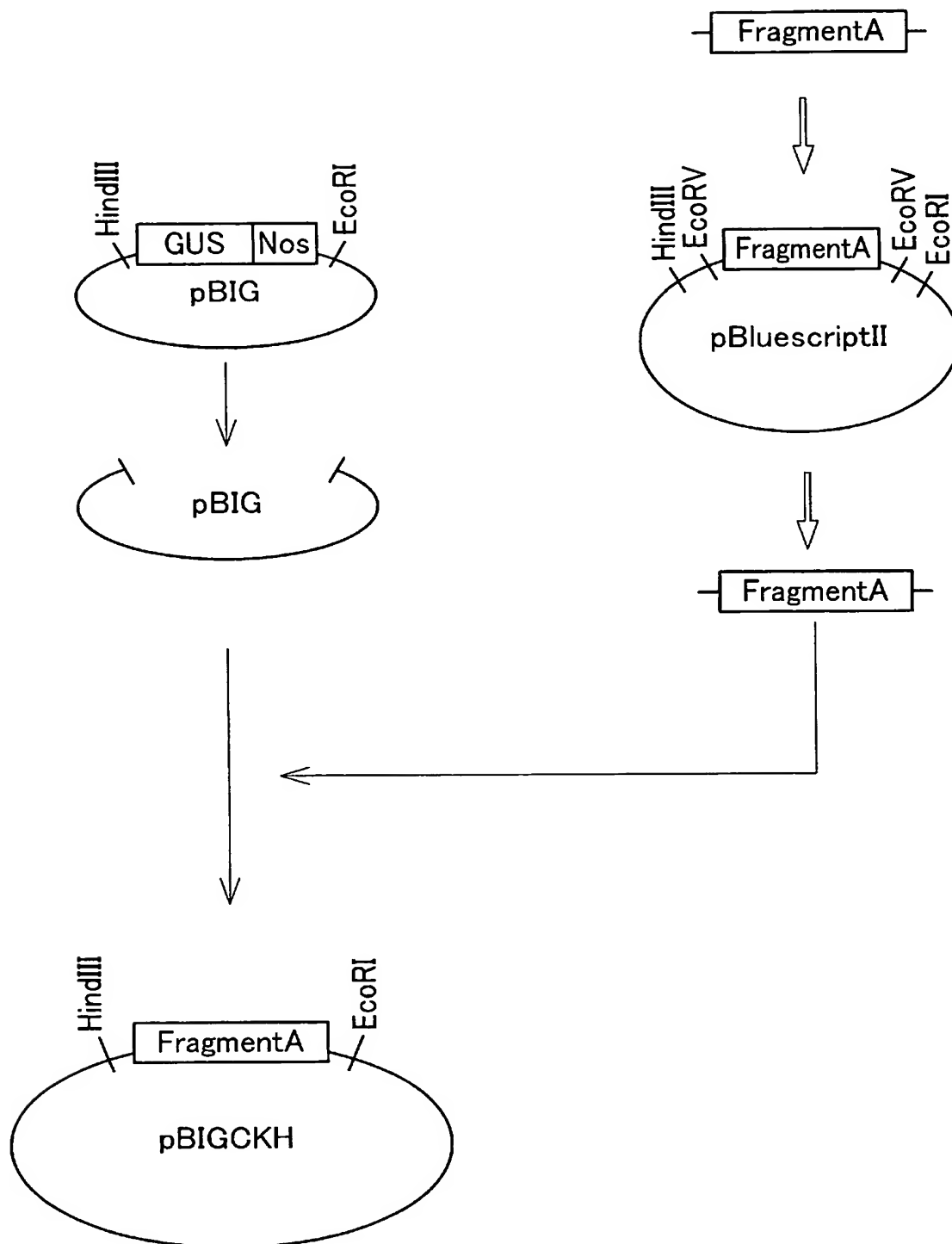
[図4]



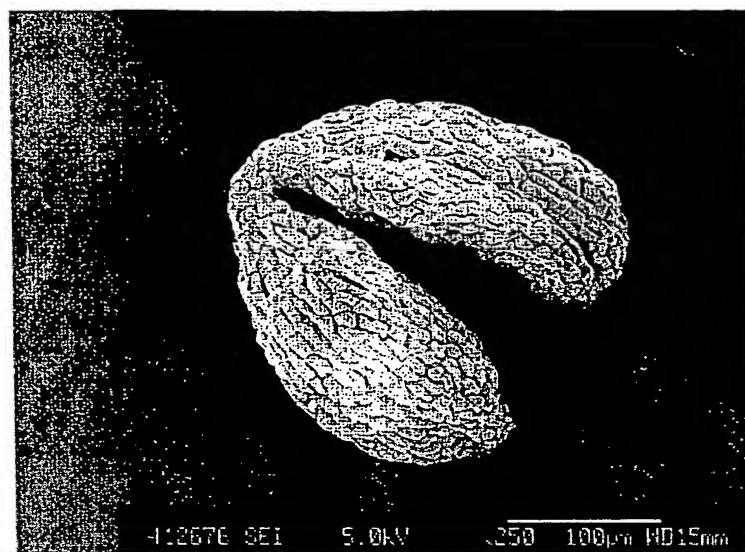
[図5]



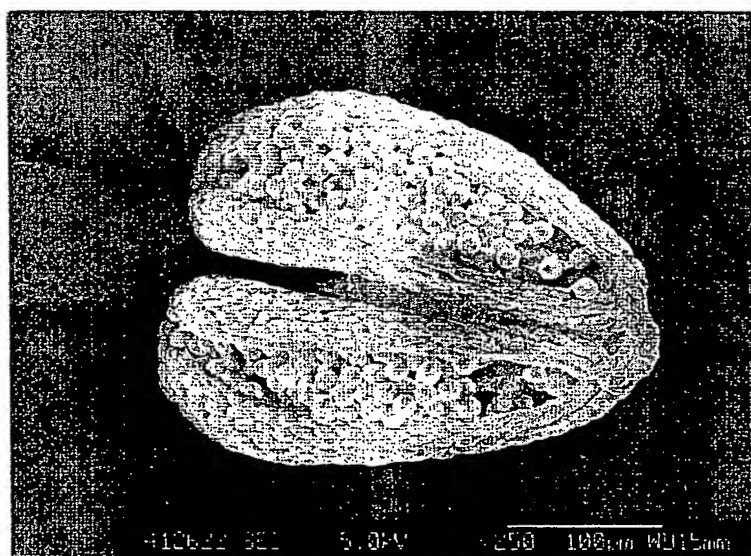
[図6]



[図7(a)]

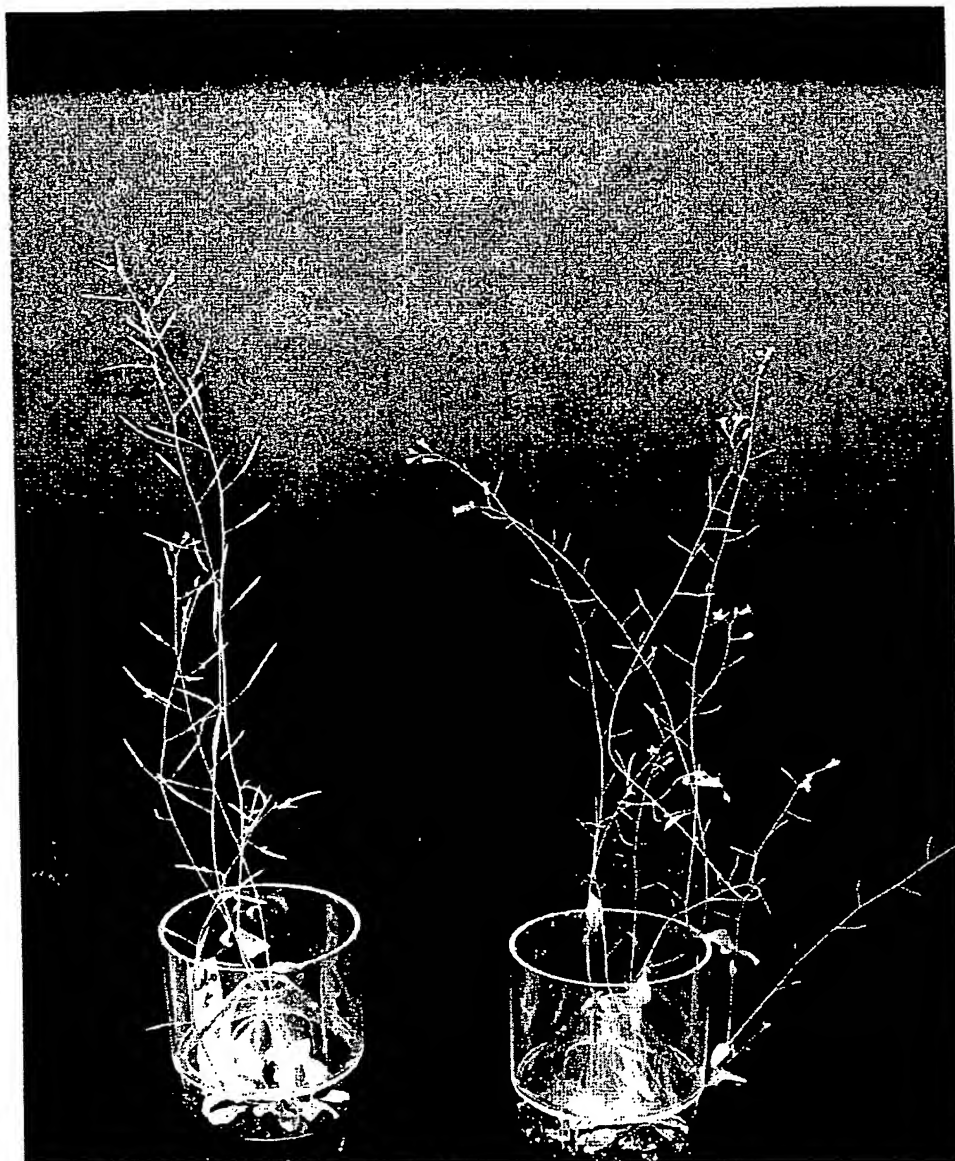


[図7(b)]

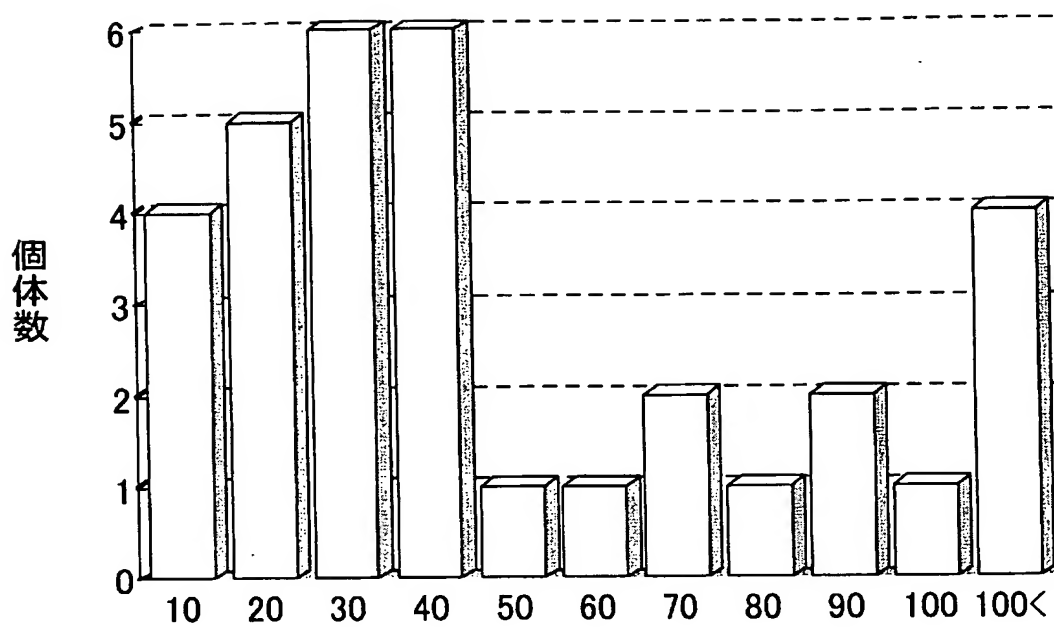




[図8]

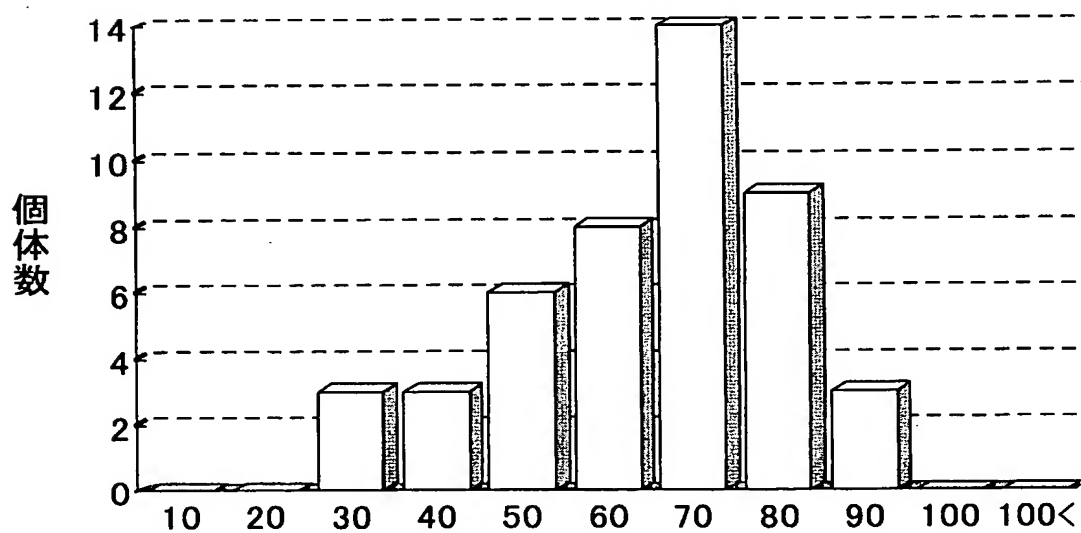


[図9(a)]



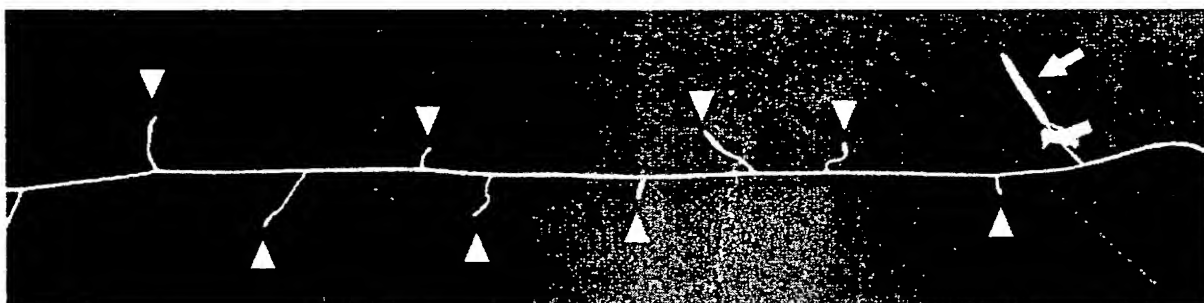
(収穫された種子の質量/種子以外の地上部の乾燥重量) × 100

[図9(b)]

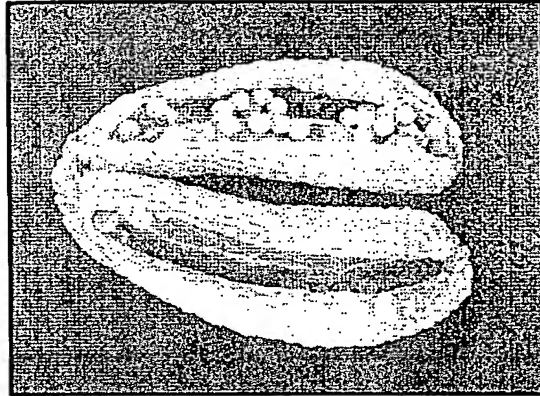


(収穫された種子の質量/種子以外の地上部の乾燥重量) × 100

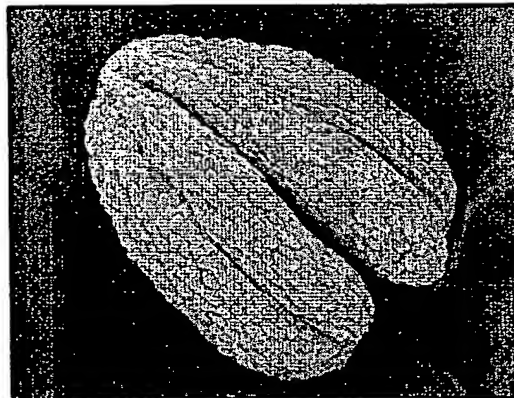
[図10]



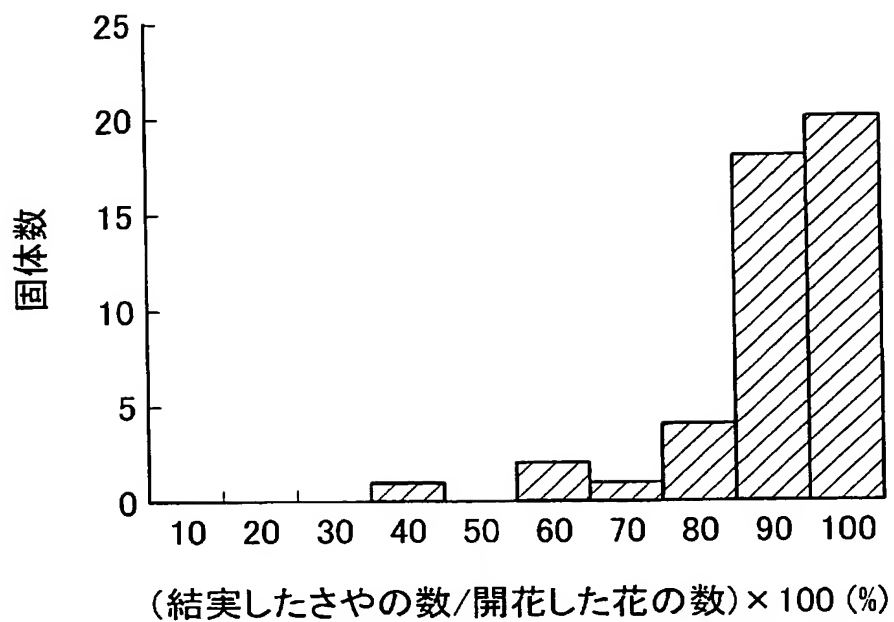
[図11(a)]



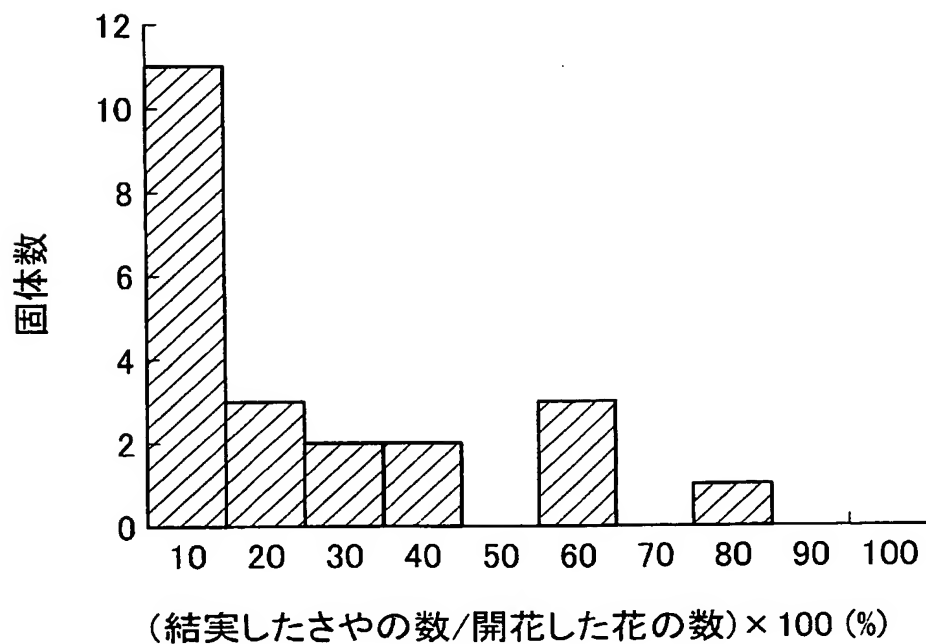
[図11(b)]



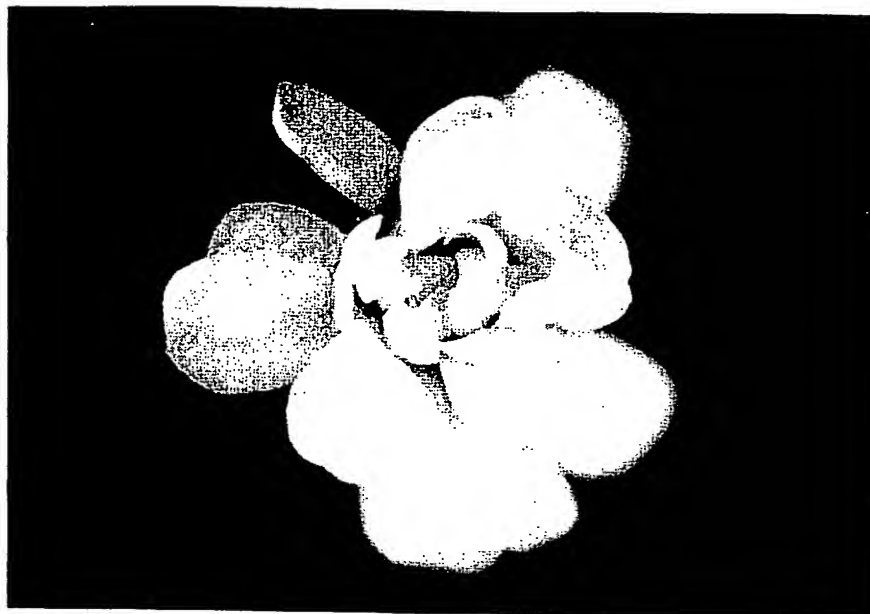
[図12(a)]



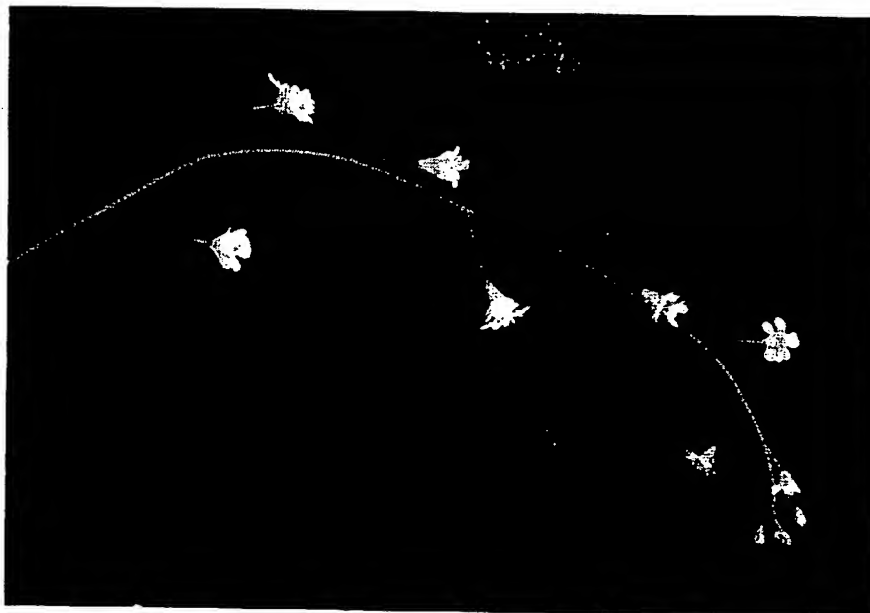
[図12(b)]



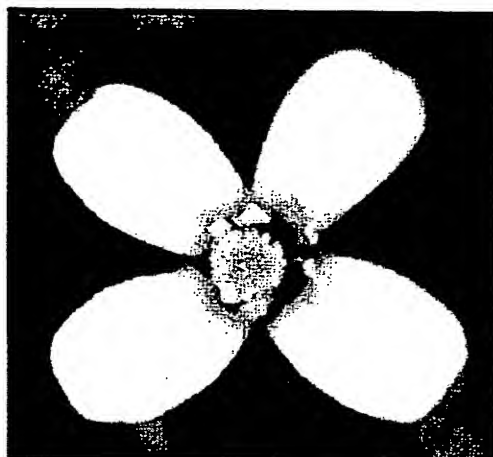
[図13(a)]



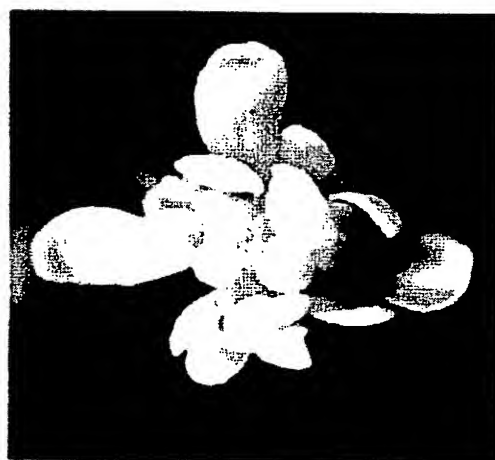
[図13(b)]



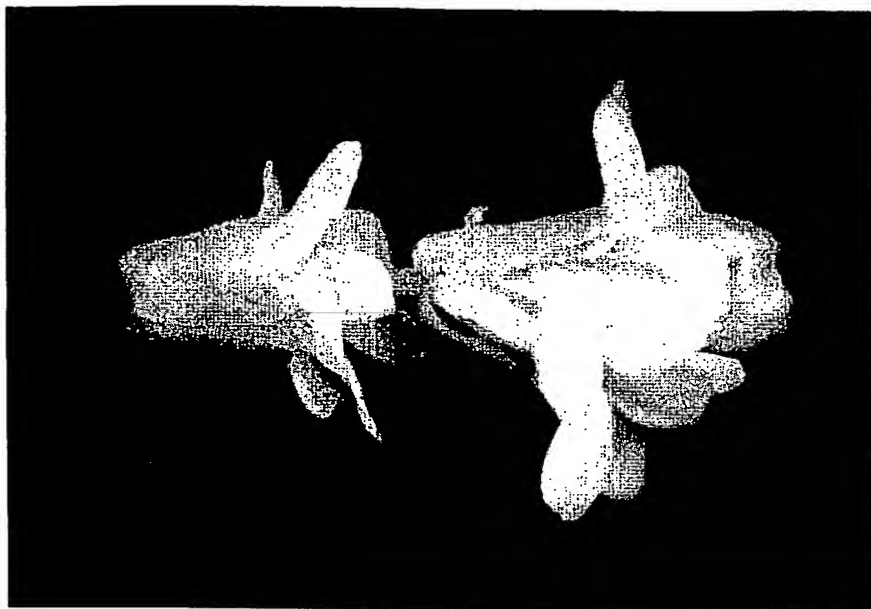
[図14(a)]



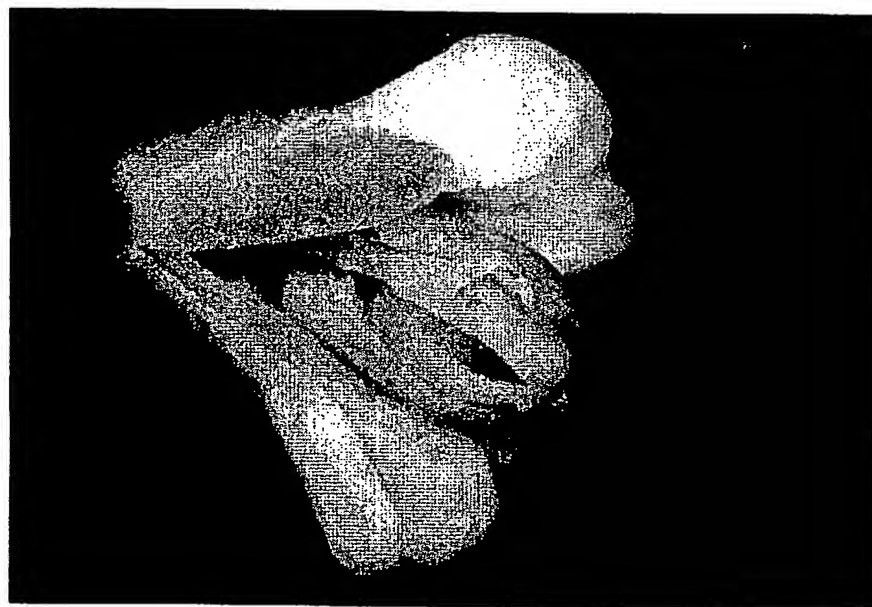
[図14(b)]



[図15]



[図16]





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000155

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> Int.Cl <sup>7</sup> A01H1/00, A01H5/00, C12N15/62		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl <sup>7</sup> A01H1/00, A01H5/00, C12N15/62		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/055903 A1 (National Institute of Advanced Industrial Science and Technology), 10 July, 2003 (10.07.03), & AU 2002367104 A1 & EP 1469010 A1	1-36
Y	HIRATSU, K. et al., Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis., Plant J. 2003, Vol.34, No.5, pages 733 to 739	1-36
Y	STEINER-LANGE, S. et al., Disruption of Arabidopsis thaliana MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers., Plant J. 2003, Vol.34, No.4, pages 519 to 528	1-36
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 01 April, 2005 (01.04.05)		Date of mailing of the international search report 19 April, 2005 (19.04.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000155

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RIECHMANN, J.L. et al., Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS., Proc.Natl. Acad.Sci.USA. 1996, Vol.93, No.10, pages 4793 to 4798	1-36
Y	WO 03/013227 A2 (MENDEL BIOTECHNOLOGY INC.), 20 February, 2003 (20.02.03), & US 2003/0226173 A1 & AU 2002323142 A1 & EP 1485490 A2	1-36

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A01H 1/00, A01H 5/00, C12N 15/62

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A01H 1/00, A01H 5/00, C12N 15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JSTPlus (JOIS), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, SwissProt/PIR/GeneSeq

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO 03/055903 A1 (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003. 07. 10 & AU 2002367104 A1 & EP 1469010 A1	1-36
Y	HIRATSU, K. et al. Dominant repression of target genes by chimeric repressors that include the EAR motif, a repression domain, in Arabidopsis. Plant J. 2003, Vol. 34, No. 5, p. 733-739	1-36

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01. 04. 2005

国際調査報告の発送日

19.04.2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4 B

9 2 8 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	STEINER-LANGE, S. et al. Disruption of Arabidopsis thaliana MY B26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. Plant J. 2003, Vol. 34, No. 4, p. 519-528	1-36
Y	RIECHMANN, J. L. et al. Dimerization specificity of Arabidopsis MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA, and AGAMOUS. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996, Vol. 93, No. 10, p. 4793-4798	1-36
Y	WO 03/013227 A2 (MENDEL BIOTECHNOLOGY INC.) 2003.02.20 & US 2003/0226173 A1 & AU 2002323142 A1 & EP 1485490 A2	1-36